



Contributo para a distinção molecular de plantas femininas e masculinas de camarinheira (*Corema album* L. D. Don)

Filipa Alexandra Veiga Marques Álvares Pereira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Agronómica, ramo Agronomia Tropical

Orientadores: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Doutora Isabel Maria Testa Neves Evaristo

Juri: Presidente: Professor Doutor Joaquim Miguel Rangel da Cunha Costa,
Professor auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da
Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Filomena de Sousa Nóbrega, Investigador auxiliar do(a)
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

Doutora Isabel Maria Testa Neves Evaristo, Investigador auxiliar do(a)
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, orientadora.



Lisboa, 2019

AGRADECIMENTOS

A viagem que fiz ao longo desta tese foi um concretizar de um sonho de já muitos anos. A minha curiosidade sobre a biologia molecular esteve sempre presente em mim. A satisfação de finalmente poder trabalhar directamente com a agronomia e a biologia molecular trouxe-me um enorme sentimento de realização.

Quero deixar um grande agradecimento a todas as pessoas especiais que tornaram esta experiência possível. Sem elas não teria conseguido:

À Prof. Doutora Mariana Mota do Instituto Superior de Agronomia por todo o seu apoio, dedicação, compreensão e sensibilidade. Realço também seu grande número de conhecimentos científicos, conduta profissional que transmitiu e um enorme empenhamento em toda a minha aprendizagem;

À Doutora Isabel Evaristo do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária de Oeiras (INIAV) por todo o seu apoio, dedicação, compreensão e paciência. Aprendi muito durante as semanas que passei no INIAV e devo-o à Doutora Isabel. Foi uma experiência inesquecível;

À Dr^a Luísa Valério do Instituto Superior de Agronomia por todo o apoio e dedicação que me deu durante o processo experimental em laboratório.

Aos meus filhos, Liv e Lucas, pela paciência que tiveram e pelas horas que tiveram de abdicar de estar com a mãe para que fosse possível completar esta etapa;

Ao meu companheiro Johan, pela paciência e apoio que me deu durante estes anos da minha formação;

RESUMO

A planta da camarinheira - *Corema album* (L.) D.Don produz um fruto rico em antioxidantes e com um enorme potencial económico, estando a sua integração no mercado dos pequenos frutos dependente do seu estabelecimento como nova cultura. Neste contexto, e sendo uma planta dióica, importa conseguir distinguir tão brevemente quanto possível, ainda na fase de viveiro, as plantas femininas das plantas masculinas. Até ao momento tal ainda não é possível, tendo que se aguardar até que a planta atinga a maturidade sexual para se determinar o seu sexo. O presente estudo pretendeu assim encontrar um marcador genético que permitisse distinguir as plantas femininas das plantas masculinas na *Corema album* (L.)D.Don numa fase prematura. A descoberta de um tal marcador sexual permitiria aos viveiros selecionar, logo no início do desenvolvimento vegetativo, as plântulas com o sexo pretendido.

Foram seguidas duas abordagens nesta investigação: a utilização de marcadores moleculares para pesquisa de padrões específicos dos genótipos femininos e masculinos da planta *Corema album* e a tentativa de amplificar nesta planta genes de distinção sexual homólogos aos presentes nas plantas *Vitis vinifera* e *Diospyros kaki*.

Foram testados 24 marcadores moleculares ISSR; quatro marcadores moleculares RAPD e três fragmentos discriminativos sexuais das plantas *Vitis vinifera* e *Diospyros kaki*, os fragmentos dos genes *VviAPRT3* (*Vitis vinifera*), *VviFSex* (*Vitis vinifera*) e *OGI* (*Diospyros kaki*). Considerando as duas abordagens, os perfis de migração dos produtos amplificados nos géis de agarose não revelaram nenhum marcador que distinguisse as amostras masculinas das femininas. É no entanto de assinalar que a análise dos perfis obtidos com os marcadores ISSRs e RAPDs revelou a existência de diversidade fenética no conjunto das amostras analisadas.

PALAVRAS-CHAVE: Camarinha (*Corema album*), marcador genético, dioicismo, ISSR e RAPD.

ABSTRACT

The plant white crowberry *Corema album* (L.) D.Don produces a fruit rich in antioxidants, which has an enormous economic potential in the small fruit market, if only it could be established there as a new product. In the context of commercializing the white crowberry, which is a dioecious plant, it is important to distinguish the female plants from the male plants as soon as possible, ideally even at the nursery stage. So far this is still not possible. Today, it is necessary to wait until the plant reaches sexual maturity to determine its sex.

The present study is aimed at finding a genetic marker that would allow to distinguish female plants from male plants in the *Corema album* (L.) D.Don at a premature stage. The discovery of such a sexual marker would allow nurseries to select, at the very beginning of vegetative development, seedlings with the intended sex.

Two approaches were followed in this research: the use of molecular markers to search for specific patterns of the female and male genotypes of the *Corema album* plant and the attempt to amplify in this plant genes of sexual distinction homologous to those present in the plants *Vitis vinifera* and *Diospyros kaki*.

We tested 24 molecular markers ISSR; four RAPD molecular markers and three sex discriminative fragments of *Vitis vinifera* and *Diospyros kaki*, fragments of the VviAPRT3 (*Vitis vinifera*), VviFSex (*Vitis vinifera*) and OGI (*Diospyros kaki*) genes. Considering the two approaches, the migration profiles of the amplified products on the agarose gels did not reveal any marker that distinguished the male samples from the female ones. It should be noted, however, that the analysis of the profiles obtained with the ISSRs and RAPDs markers revealed the existence of phenetic diversity in the analyzed samples.

KEYWORDS: Camarinha (*Corema album*), genetic marker, dioicism, ISSR and RAPD.

Índice

	PÁG.
Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice	IV
Lista de Figuras	VII
Lista de Quadros	VIII
Lista de Siglas e Abreviaturas	IX
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	2
2.1 A <i>Corema album</i>	2
2.1.1 Clima, condições edáficas e caracterização botânica da <i>Corema album</i>	2
2.1.2 A Importância económica da <i>Corema album</i>	3
2.2 Dimorfismo sexual na <i>Corema album</i>	4
2.3 A diferenciação sexual em plantas dióicas	6
2.4 Marcadores moleculares	12
2.4.1 Marcadores moleculares baseados na amplificação de DNA in vitro	14
2.4.1.1 Marcadores moleculares baseados na amplificação de DNA in vitro usando primers RAPD	14
2.4.1.2 Marcadores moleculares baseados na amplificação de DNA in vitro usando primers ISSR	18
2.5 Os genes relacionados com o dimorfismo sexual no caso das plantas <i>Diospyros kaki</i> e <i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i>	19

3 Material e Métodos	22
3.1 Análise Molecular de genótipos de <i>Corema album</i> com marcadores ISSR e RAPD	22
3.1.1 Material vegetal	22
3.1.2 Extração de DNA de <i>Corema album</i>	23
3.1.2.1 Determinação da concentração de DNA das amostras de <i>Corema album</i> num espectrofotometria	24
3.1.2.2 Teste da qualidade das amostras da <i>Corema album</i> por eletroforese	24
3.1.3 Amplificação das amostras por PCR com os <i>primers</i> ISSR	24
3.1.4 Amplificação das amostras por PCR com os <i>primers</i> RAPD	25
3.1.5 Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com <i>primers</i> ISSR e <i>primers</i> RAPD	26
3.1.6 Análise de dados	27
3.2. Análise molecular com <i>primers</i> amplificadores de genes discriminadores do sexo: OGI (gene sexual do <i>Diospyros kaki</i>); VviAPRT3 e VviFSEX (genes sexuais da <i>Vitis vinifera</i>).	29
3.2.1 Material vegetal	29
3.2.2 Extração e isolamento de DNA das amostras de videira (<i>Vitis vinifera ssp. vinifera</i>) e diospiro (<i>Diospyros kaki</i>)	29
3.2.3 Medição da quantidade e qualidade de DNA no espectrofotómetro	29
3.2.4. Desenho dos <i>primers</i> dos genes OGI, VviAPRT3, e VviFSEX	29
3.2.5 Eletroforese para testar o DNA existente nas amostras de videira (<i>Vitis vinifera ssp. vinifera</i>) e dióspiro (<i>Diospyros kaki</i>).	30
3.2.6 Amplificação por PCR das amostras de videira e diospiro com o primer 18S rRNA	31
3.2.7 Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR das amostras de videira e diospiro com o <i>primer</i> 18S rRNA	31
3.2.8 Amplificação por PCR das amostras de videira e diospiro com os <i>primers</i> VviAPRT3, VviFSEX e OGI	31

3.2.9 Eletroforese dos produtos da PCR do DNA da videira e diospiro com os <i>primers</i> VviAPRT3, VviFSEX e OGI	31
3.2.10 Amplificação por PCR do DNA da <i>Corema album</i> com os <i>primers</i> VviAPRT3, VviFSEX e OGI.	32
3.2.11 Eletroforese dos produtos da PCR do DNA das amostras de <i>Corema album</i> com os <i>primers</i> VviAPRT3, VviFSEX e OGI.	32
4 Resultados e Discussão	33
4.1 Análise molecular com marcadores ISSR e RAPD nas amostras de <i>Corema album</i>	33
4.1.1 Análise molecular com ISSR	34
4.1.2 Análise molecular com RAPD	36
4.2 Análise molecular com <i>primers</i> amplificadores de genes discriminadores do sexo : OGI (gene sexual do <i>Diospyros kaki</i>); VviAPRT3 e VviFSEX (genes sexuais da <i>Vitis vinifera</i>)	38
5 Considerações Finais	40
6 Referências Bibliográficas	42
Anexos	52

Lista de Figuras	PÁG.
Figura 1 - Caraterização botânica da <i>C. Album</i>	2
Figura 2 - Aspetos conclusivos sobre o dimorfismo sexual na <i>C. album</i>	6
Figura 3 - Esquema resumido sobre a diferenciação sexual em plantas dióicas	11
Figura 4 - Aspeto geral do ensaio de plantações de <i>Corema album</i> localizado na Herdade Experimental da Fataca em Odemira.	34
Figura 5 - Gel de agarose com DNA total obtido após extração com DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) - A comparação foi feita com o marcador com fragmentos de tamanho conhecido (λ 125 ng.µl).	34
Figura 6 – Gel de agarose com os produtos de amplificação (ISSR) gerados a partir de DNA genómico de 18 amostras de <i>C. album</i> utilizando o oligonucleótido iniciador (<i>primer</i>) (AG)8T. M marcador com fragmentos de tamanho conhecido (100-3000 pares de bases).	35
Figura 7 – Dendrograma de consenso obtido com os primers ISSR (TG)8RT, (TCC)5, (TG)7, DBD(AC)7, (AG)8T, obtido com o <i>software</i> NTSYSpc-Version 2.02 usando o coeficiente de correlação DICE e UPGMA.	35
Figura 8 – Gel de agarose com os produtos de amplificação (RAPD) gerados a partir de DNA genómico de 14 amostras de <i>C. album</i> utilizando o oligonucleótido iniciador OPB7 e marcador M com fragmentos de tamanho conhecido (250-10000 pares de bases).	36
Figura 9 – Dendrograma de consenso com os primers RAPD OPA10, OPA13, OPB7 e OPC5 obtido com o <i>software</i> NTSYSpc-Version 2.02 usando o coeficiente de correlação DICE e UPGMA.	37
Figura 10 - Imagem de geis de agarose referente a duas amostras de videira: a) amplificadas com o <i>primer</i> do gene VviAPRT3; b) amplificadas com o <i>primer</i> do gene VviFSEX e c) imagem do gel de agarose referente a três amostras de diospiro amplificadas com o <i>primer</i> do gene OGI.	39

Lista de Quadros	Página
Quadro 1 - Estudos em diferenciação sexual de várias plantas utilizando marcadores RAPD. Nota: F (feminino), M (masculino) e H (hermafrodita)	17
Quadro 2 - Identificação de genótipos selecionados de <i>Corema album</i> e respetivo local de colheita.	23
Quadro 3 - Quadro informativo sobre os 24 <i>primers</i> utilizados, temperatura de emparelhamento e sequência de nucleótidos	24
Quadro 4 - Quadro informativo sobre os quatro <i>primers</i> RAPD utilizados, temperatura de emparelhamento e sequência de nucleótidos	26
Quadro 5 - Sequência de primers amplificadores de genes discriminadores do sexo: OGI (gene sexual do <i>Diospyro kaki</i>); VviAPRT3 e VviFSEX (genes sexuais da <i>Vitis vinífera</i>).	30
Quadro 6 - Concentração de DNA das amostras de camarinhas determinada no espectrofotómetro Nanodrop.	33
Quadro 7 – Concentração de DNA das amostras de Videira e Diospiro determinada por espectrofotometria.	38

Lista de Siglas e Abreviaturas		Lista de Siglas e Abreviaturas	
Abs	Absorvância	K	Potássio
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>	Kb	<i>Kilobase pairs</i>
Be	Brometo de etídio	log 10	Logaritmo de base 10
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	M	Molar
°C	Graus Celsius	mM	Milimol
Ca	Cálcio	Mg	Magnésio
cM	Centimorgan	Mg	Miligramas
Cm	Centímetros	MgCl ₂	Cloreto de magnésio
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i>	mL	Mililitros
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Mm	Milímetros
dNTP	Desoxinucleótido Trifosfato; engloba dATP, dCTP, dGTP, dTTP ^{[1][2][3][4][5][6][7][8][9][10]}	Mn	Manganês
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	N	Azoto
GC	Guanina e Citosina	NaCl	Cloreto de sódio
H	Horas	NJ	<i>Neighbor joining</i>
H ₂ O	Água	Nm	Nanómetro
HCl	Ácido Clorídrico	OUT	<i>Operational Taxonomic Units</i>
HEF	Herdade Experimental da Fataca	P	Fósforo
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária	Pb	Pares de bases
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	<i>Potential of Hydrogen</i>		

**Lista de Siglas
e Abreviaturas**

PVP	Polivinilpirrolidona
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
RNA	Ribonucleic acid
RNAse	Ribonucleic acid enzyme
RPM	Rotações por minute
Taq	DNA Polimerase da <i>Thermus aquaticus</i>
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i>
S _D	Coeficiente de DICE
TBE	Tampão de Eletroforese Tris-borato-EDTA
Te	Temperatura de emparelhamento de um <i>primer</i>
TE	Tris/EDTA
Mg	Micrograma
μL	Microlitro
Uni	Unidade
UV	Ultra violetas
V	Volts

1. Introdução

A *Corema album* (L.) D. Don, de nome comum camarinha ou camarinheira, é uma espécie originária das dunas da costa atlântica da Península Ibérica. É uma planta ainda pouco estudada, desconhecendo-se o seu comportamento em prática agrícola. O seu sistema reprodutivo ao nível molecular ainda é desconhecido. Tem a grande limitação de ser uma planta dióica, logo de difícil estabelecimento como cultura. Os arbustos masculinos e femininos da *Corema album* não se distinguem facilmente. Só no momento da sua floração é que é possível saber quais são as plantas masculinas e femininas. Apenas após ter decorrido cinco a seis anos da germinação da planta é que é possível saber o seu sexo. Tal facto, leva a que esta planta seja difícil de utilizar pelos viveiros. É uma planta difícil de cruzar e propagar, logo, é difícil também implementar programas de melhoramento e de cultivo da *C. album*. Esta tese surge assim do interesse em conseguir um teste molecular que permita distinguir o sexo desta planta num estágio de desenvolvimento inicial e poupar assim vários anos à espera do desenvolvimento da planta até ao estado juvenil reprodutor.

O potencial económico da planta é grande. Ela é consumida pelas populações atlânticas costeiras da Península Ibérica há vários séculos e é até vendida em alguns mercados na Galiza. O fruto tem um sabor agradável e doce, sendo por isso muito apreciado pelo consumidor (Gonzalez, 2001). É também rico em antioxidantes e nutrientes. Este produto tem o grande potencial de poder ser apreciado pelo consumidor dos pequenos frutos que procura alargar a diversidade no seu consumo de bagas saudáveis.

A caracterização sexual da *C. album* tem sido feita, essencialmente, com base na observação das características fenotípicas qualitativas e quantitativas da planta em estado juvenil reprodutivo. Esta observação morfológica é que tem servido para distinguir os arbustos femininos dos masculinos. A comparação tem sido feita principalmente através da observação das diferenças entre as flores nos dois tipos de arbustos (Pablo *et al.*, 2013).

Assim, tendo como pressuposto que a utilização de marcadores moleculares constitui uma das novas vias para a investigação das diferenças sexuais em plantas dióicas, no caso em estudo, na planta *C. album*, iremos recorrer à utilização de marcadores ISSR (Zietkiewicz *et al.* 1994), marcadores RAPD (William *et al.*, 1990) e de primers específicos indetectores de genes sexuais na planta *Vitis vinifera* (João *et al.*, 2017) e *Diospyros kaki* (Ping-Xian *et al.*, 2016) que possam identificar genes semelhantes na *C. album*.

Constituem objectivos específicos desta dissertação:

- encontrar um ou mais marcadores ISSR ou RAPD que permitam distinguir claramente as plantas femininas das masculinas da espécie *C. album* numa fase prematura;
- identificar genes homólogos na *Corema album* aos genes discriminantes do sexo existentes nas plantas *Vitis vinifera* (genes VviFSEX e VviAPRT3) e *Diospyros kaki* (gene OGI).

Sendo possível encontrar um marcador para discriminar o sexo na *C. album*, este poderá ser usado por viveiristas que pretendam realizar uma seleção das plântulas a desenvolver para posterior uso em culturas agronómicas controladas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 A *Corema album*

2.1.1 Clima, condições edáficas e caracterização botânica

A espécie *Corema album* (L.) foi classificada por D. Don como pertencente à família Ericaceae e subfamília Ericoideae. É uma de duas espécies do género *Corema*, sendo *Corema conradii* (Torr.) Torr. ex Loudon, a outra espécie (Oliveira e Dale, 2012). A espécie possui 26 cromossomas (Tutin *et al.*, 1972).

A planta *Corema conradii* existe na costa este da América do Norte. É possível distinguir estas duas espécies observando o tamanho dos seus frutos. A espécie *C. album* apresenta frutos maiores, com uma parte carnuda, enquanto os frutos da *Corema conradii* são menores desprovidos de parte carnuda e com apêndices oleosos (Martine *et al.*, 2005).

A *C. album*, segundo Valdés *et al.* (1987), apresenta duas subespécies: a subespécie *album* e a subespécie *azoricum* P.Silva, sendo distintas as suas localizações geográficas.. A subespécie *album* apresenta-se na costa atlântica da península ibérica, de Gibraltar a Finisterra no Noroeste da Galiza. A subespécie *azoricum* ocorre nas ilhas dos Açores (Oliveira e Dale, 2012) colonizando lavas e cinzas vulcânicas (Figura 1).

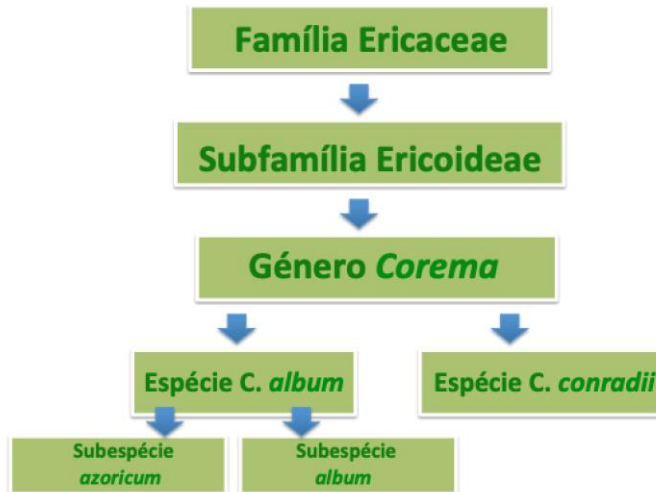


Figura 1 - Caraterização botânica da *C. Album*

O habitat natural da *C. album* ocorre maioritariamente em dunas, podendo ocorrer em zonas rochosas e campos vulcânicos como nos Açores e Cabo Carvoeiro (Calviño-Cancela, 2004).

A *C. album* é um arbusto com uma altura média entre os 30 a 75cm, podendo atingir um metro de altura. A planta é dióica com folhas (8 a 10 mm de comprimento e 1mm de largura) em verticilos de 3 ou 4, com pecíolos curtos que estão junto ao ramo (Oliveira e Dale, 2012).

Apesar de ser uma planta dióica, apresenta entre 1 a 4% de plantas masculinas com

inflorescências hermafroditas (Zunzunegui *et al.*, 2006).

As flores são actinomorfas, dividindo-se em três ou mais sectores idênticos radialmente simétricos, e aparecem em inflorescências terminais em grupos de quatro a catorze. As flores masculinas têm três sépalas suborbiculares e pubescentes com 2 a 3 mm, três pétalas rosadas com 3 a 5 mm, e três estames de 5 a 6 mm com anteras vermelhas bastante visíveis. As flores femininas são mais pequenas, têm sépalas com 1 a 2 mm, e pétalas de 1 mm. O ovário nestas flores é superior com um estilete presente e o estigma tem três lóbulos vermelhos (Simonds, 1979 e Tutin *et al.*, 1972).

Os frutos são drupas brancas tipo bagas com 5 a 8 mm de diâmetro. Quando estão maduros os frutos podem apresentar uma coloração branco pérola ou ficar mais translúcidos (Oliveira e Dale, 2012). Cada fruto tem normalmente três sementes (Simonds, 1979 e Tutin *et al.*, 1972). O fruto é comestível e tem um sabor agradável e fresco apesar de moderadamente ácido (Gonzalez, 2001). Os frutos são ricos em antioxidantes, contêm baixos valores de antocianinas, elevadas quantidades de flavinol e de derivados dos ácidos clorogénico e fenólico (Santos *et al.*, 2009).

O solo ideal para o desenvolvimento da *C. album* tem que ter pelo menos 70% de areia e 30% de argila. O teor de material orgânico deve variar entre os 0% e os 2.6%. O pH ideal situa-se entre os 5,6 e 7,8. A matéria inorgânica é usualmente baixa embora os valores de Mn e K possam ser elevados (Hellmann *et al.*, 2011 e Marques, 2007).

O clima desta espécie é o típico da costa oeste Atlântica que vai desde a Galiza até Gibraltar. O clima é caracterizado por temperaturas moderadas e elevada precipitação no Inverno e temperaturas altas e baixa precipitação no Verão (Rivas-Martinez *et al.*, 2000).

A *C. album* cresce vegetativamente entre fevereiro e julho, atingindo um pico entre abril e junho. As plantas florescem de fevereiro a abril. Os frutos ficam amadurecidos entre junho e julho no sul de Portugal e entre agosto e setembro no norte do país. Os frutos permanecem na planta até outubro e na zona norte até dezembro (Alvarez-Cansino *et al.*, 2010, Gonzalez 2001, Valdes *et al.*, 1987). O florescimento é em sincronia nos arbustos masculinos e femininos (Gutián *et al.*, 1997). A longevidade da planta *C. album* é desconhecida. A planta *Corema conradii* julga-se viver entre 25 a 35 anos (Martine *et al.*, 2005).

A *C. album* é um arbusto que se adapta e tolera bem níveis de humidade no solo baixos. O crescimento de novos ramos ocorre em curtos espaços de tempo no fim da Primavera, início do Verão (Alvarez-Cansino *et al.*, 2010a, Máguas *et al.*, 2011).

A propagação da planta faz-se essencialmente por disseminação da semente por via eólica e por animais. A germinação é optimizada quando o fruto é ingerido pelos animais e quando estes libertam posteriormente as sementes em locais favoráveis à germinação (Calviño-Calcela, 2004).

2.1.2 A importância económica da *Corema album*

Há muitos séculos que o fruto da *C. album* é consumido fresco em algumas populações e vendido em mercados de rua em zonas como a Galiza em Espanha. O fruto também tem sido usado na medicina tradicional em tratamentos contra a parasitose intestinal (Gonzalez, 2001).

O fruto tem um sabor agradável, contém elevados níveis de antioxidantes e um grande valor

nutricional. O consumidor informado destas propriedades do fruto, terá interesse em adquiri-lo e a sua comercialização em locais de mais fácil acesso será frequente (grandes superfícies comerciais).

A colheita do fruto poderá ser mecanizada devido ao facto do fruto ter uma pele muito resistente e com uma elevada capacidade de conservação (Oliveira *et al.*, 2012).

O local de produção do fruto da *C. album* seria na costa atlântica da Península Ibérica com o potencial de ser expandida por todo o sul da Europa e costa mediterrânica.

2.2 Dimorfismo sexual na *Corema album*

As plantas dióicas apresentam dimorfismo entre plantas masculinas e femininas, não apenas em relação às características sexuais mas também em várias características morfológicas vegetativas. Estas diferenças ao nível vegetativo são consideradas como dimorfismo sexual secundário. Como as plantas femininas produzem, para além dos seus órgãos sexuais, também frutos e sementes, estas têm um custo reprodutivo muito maior que as masculinas (Zunzunegui *et al.*, 2006).

A determinação sexual em plantas dióicas pode ser de origem genética ou do ambiente em que a planta se encontra. Nos casos em que a origem é genética, a determinação sexual pode estar associada a apenas um locus num autossoma, vários loci em vários autossomas ou genes em cromossomas heteromórficos (Irish e Nelson, 1989).

Diferenças nas características morfológicas têm sido observadas nas plantas masculinas e femininas de diferentes espécies dióicas. A possibilidade de usar características morfológicas como marcadores sexuais foi já muito investigada.

Lacombe (1980) observou diferença significativa no comprimento entre nós da planta e taxa de crescimento das plantas femininas e masculinas de cânhamo dioico *Cannabis sativa*. Ele referiu que o sexo das plantas pode ser determinado com a idade de 15 dias, com base nas características vegetativas iniciais.

Chen *et al.* (1985) referiram 100% de correlação entre o sexo e a relação comprimento/largura das folhas de Jojoba. Observou ainda, que a relação comprimento/largura de todas as plantas femininas era maior que a das plantas masculinas.

Oyama (1990) relatou que na planta dióica *Chamaedorea tapijelute*, as plantas masculinas apresentaram variação espacial na taxa de crescimento, mas tal não acontecia com as femininas. Ambos os sexos apresentaram diferentes taxas de produção de folhas ao longo dos anos. As plantas masculinas produziram significativamente mais inflorescências do que as femininas.

Kohorn (1994) observou que na planta Jojoba, *Simmondsia chinensis* as plantas femininas tinham folhas maiores e copas mais abertas do que as masculinas.

Machon *et al.* (1995) constataram que na planta *Asparagus officinalis* as masculinas produziam mais caules mas mais finos do que as femininas.

Num estudo de Zunzunegui (2006) sobre o processo reprodutivo da *C. album* no noroeste da Península Ibérica, verificou-se que as flores masculinas eram maiores e mais pesadas que as flores femininas, apesar do investimento global no sistema sexual ser maior nas flores femininas. A floração observou-se ser fenologicamente sincronizada entre as flores femininas e masculinas.

Os diferentes requisitos para a reprodução nas plantas masculinas e femininas da *C. album* levam a que tenham também diferentes respostas fisiológicas aos constrangimentos existentes no meio em que se encontram (stress hídrico, temperatura e radiação) (Nicotra *et al.*, 2003). Em algumas situações as plantas femininas desenvolvem mecanismos de compensação, como maiores taxas fotossintéticas do que as masculinas, através do aumento da condutância nos estomas. Isto implica um maior esforço por parte das plantas femininas, o que leva a uma maior dependência dos recursos hídricos no meio (Dawson e Ehleringer, 1993; Hultine *et al.*, 2007).

Foi observado, num outro estudo, um maior desenvolvimento das raízes na *C. album*, durante a época mais seca, de forma a garantir as suas necessidades hídricas (Álvarez-Cansino *et al.*, 2010b). As plantas femininas desta espécie têm uma raiz mais profunda do que as masculinas (Álvarez-Cansino *et al.*, 2010a,b, 2012). Também têm um custo de reprodução três vezes maior relativamente às masculinas (Zunzunegui *et al.*, 2006; Álvarez-Cansino *et al.*, 2010a,b). Nesse mesmo estudo observou-se que o rácio de distribuição sexual não tem qualquer influência do meio em que se encontram (Álvarez-Cansino *et al.*, 2010a,b, 2012).

Num estudo sobre a ecofisiologia, período de crescimento e recursos alocados na reprodução das três formas sexuais da *C. album* constatou-se que as plantas hermafroditas investem maiores recursos na reprodução do que as plantas femininas. As suas flores são maiores e as flores masculinas contêm mais pólen. No entanto, se o esforço for estimado ao longo do ciclo anual da planta, as plantas femininas da *C. album* investem três vezes mais biomassa na reprodução do que as plantas masculinas e as plantas hermafroditas, essencialmente devido à sua produção de frutos e sementes (Zunzunegui *et al.*, 2006).

O maior esforço reprodutivo nas plantas femininas está correlacionado com um menor crescimento vegetativo. A produção menor de flores e frutos nas plantas hermafroditas e também o menor tamanho dos frutos e sementes permite que estas plantas invistam mais no crescimento vegetativo (Zunzunegui *et al.*, 2006).

A existência de plantas hermafroditas de *C. album*, apenas nas populações do sul de Portugal e Espanha, onde se regista uma menor precipitação anual e maior stress hídrico, parece sugerir a existência de um mecanismo populacional ou ecológico que explica a existência destas plantas em condições climáticas e edáficas difíceis (Zunzunegui *et al.*, 2006). Neste estudo, Zunzunegui *et al.*, 2006, descobriram ainda que as plantas hermafroditas da *C. album* são fisiologicamente menos favorecidas que as plantas unissexuais e que podem ser mantidas como resultado da seleção natural de forma a garantir o sucesso reprodutivo da população quando a sua densidade é muito baixa.

Um outro estudo constatou que a população de *C. album* apresenta um padrão associado às condições ambientais assim como aos gradientes climáticos de uma determinada área. Embora as variáveis ambientais locais, como a velocidade do vento ou as características do solo, possam modelar a densidade e a estrutura de uma população, o padrão observado no caso da *C. album* comprovou que as variáveis de precipitação e temperatura são os fatores principais (Álvarez-Cansino *et al.*, 2012).

Uma maior precipitação nas regiões norte do habitat da *C. album*, traduz-se em plantas femininas com maiores dimensões. Estes resultados sugerem existir respostas fisiológicas específicas a cada sexo às condições do meio. São igualmente referidas diferentes estratégias em relação ao uso

da água nas plantas dióicas nos dois sexos (Xu *et al.* 2008). Segundo Dawson e Bliss, 1989 as plantas femininas dióicas são menos eficientes no uso da água, especialmente em condições de stress hídrico, devido à sua grande necessidade em água e nutrientes para a produção da semente e fruto.

Num outro estudo sobre os custos de reprodução nas plantas femininas e masculinas da *C. conraddi*, Anne-Françoise e Houle (2001) observaram que as plantas masculinas investem mais na reprodução durante a formação da flor, mas quando a produção do fruto é considerada, as femininas investem mais em termos de biomassa, Mg e Ca e menos em N, P e K. Devido ao custo geral na reprodução ser menor nas plantas masculinas, estes tendem a ter um maior crescimento vegetativo e um maior índice de sobrevivência do que as femininas. Existe, portanto, uma certa tendência das plantas masculinas se apresentarem em maior número nas populações desta espécie.

Se estas diferentes respostas fisiológicas das plantas masculinas e femininas da *C. album* ao meio ambiente em que se encontram têm uma origem genética, epigenética ou hormonal é um dado incerto pois ainda não houve suficiente investigação na área para chegar a uma conclusão (Figura 2).

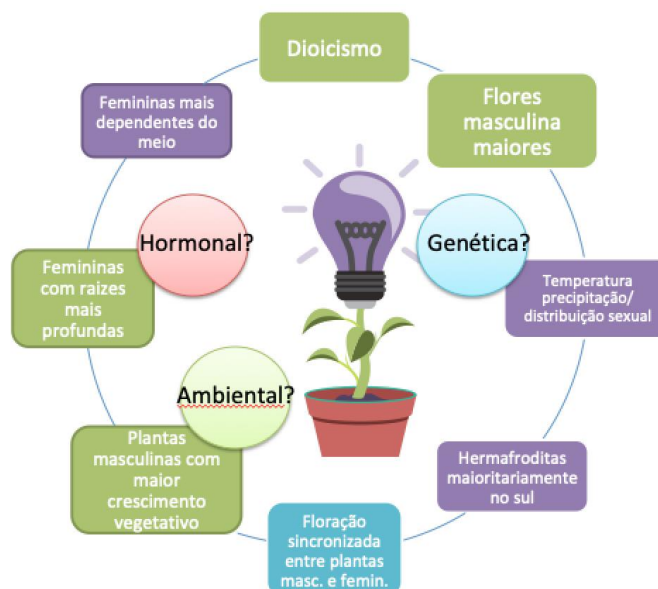


Figura 2 – Aspectos conclusivos sobre o dimorfismo sexual na *C. album*

2.3 A diferenciação sexual em plantas dióicas

A maioria das plantas florescentes é hermafrodita. O dioecismo é uma condição em que as flores masculinas e femininas nascem em plantas separadas. Este está bem estabelecido nos animais, mas ocorre esporadicamente nas plantas. Conhecem-se apenas em 1500 espécies em 1303 géneros e 170 famílias (Charlesworth, 1985).

A grande maioria das plantas com flores (cerca de 90%) produzem flores perfeitas. Essas plantas hermafroditas são estaminadas e pistiladas (com um ou mais carpelos). Dez por cento das espécies de plantas desenvolveram a unissexualidade floral com separação espacial das suas flores (Yampolsky e Yampolsky, 1922). Denominam-se plantas monóicas, quando os órgãos masculinos e femininos se encontram na mesma planta e plantas dióicas, sempre que as flores masculinas e

femininas se localizam em indivíduos independentes, como é o caso da *C. album*.

A determinação sexual em plantas dióicas é um assunto fascinante com importância evolucionária, biológica e econômica. Compreender o mecanismo da determinação sexual em espécies dióicas tem sido uma tarefa difícil. Até à data foram documentados três mecanismos básicos de determinação do sexo: genético, epigenético e hormonal. Estes três mecanismos provavelmente controlam a expressão sexual em espécies dióicas (Sinchan *et al.*, 2016).

Num pequeno número de espécies de plantas, a transição do hermafroditismo foi seguida pela evolução dos cromossomas sexuais, que presumivelmente evoluíram como consequência da necessidade de limitar a recombinação entre os diferentes genes determinantes do sexo na planta. Foram detectados cromossomas sexuais heteromórficos em plantas superiores pela primeira vez em *Rumex acetosa* e na *Silene dióica* (*Melandrium rubrum*) por Kihara e Ono (1923) e Blackburn (1923).

Existem, documentados em plantas dióicas, três tipos de mecanismos de determinação sexual nos cromossomas: o cromossoma Y ativo (ou sistema XX/XY), a relação cromossoma X com os autossomas (X: A) e o sistema ZZ / ZW (Heikrujam *et al.*, 2015).

No sistema do cromossoma Y ativo, o cromossoma Y tem genes dominantes das características masculinas e genes supressores das características femininas (Van, 1966ab). Por exemplo, as espécies de *Silene* têm um sistema de um cromossoma Y ativo semelhante ao dos mamíferos, onde este cromossoma atua como um potenciador da masculinidade, além de suprimir o gineceu da planta (Grant *et al.*, 1994). A presença de apenas um único cromossoma Y consegue suprimir o desenvolvimento feminino quando três cromossomas X estão presentes. Um maior número de cópias do cromossoma X consegue sobrepor-se ao efeito masculinizante do cromossoma Y. O rácio dos autossomas não produz efeito nos fatores de determinação sexual do cromossoma Y. Isto sugere que o cromossoma Y é decisivo na determinação sexual deste tipo de plantas dióicas. Três diferentes regiões do cromossoma Y foram identificadas como tendo funções distintas na determinação sexual (Westergaard, 1946). Uma zona numa ponta contém um fator genético que suprime a formação do gineceu, uma outra zona na ponta oposta contém os fatores de fertilidade masculina e a região central contém os genes necessários para a formação das anteras. O cromossoma Y contém a relação completa entre supressores femininos e os genes essenciais para a formação masculina (Westergaard, 1946).

Em relação ao sistema X:A sabemos que é determinado por um equilíbrio entre os genes dos autossomas e os genes do cromossoma X. Este tipo de determinação sexual denomina-se sistema de equilíbrio génico. As espécies *Humulus lupulus*, *H. japonicas* e *Cannabis sativa* (família das Cannabidaceae) desenvolveram cromossomas sexuais do tipo de X/autossómico (Jacobsen, 1957; Parker, 1990). Neste sistema, um número determinado de genes influencia o desenvolvimento sexual. O cromossoma X contém genes que produzem efeitos femininos na planta e os autossomas contêm genes que induzem a masculinização. Como consequência, o sexo da planta é determinado pela proporção X: A, o número de cromossomas X dividido pelo número de conjuntos haploides de cromossomas autossómicos (Stephen e Alejandro, 1993).

Nas espécies que apresentam o sistema de determinação do sexual ZW/ZZ, as plantas masculinas e as femininas diferem do mesmo modo como nos mamíferos, porém, são as plantas femininas que possuem dois cromossomas diferentes e não as masculinas. Os cromossomas sexuais

presentes tanto nas plantas femininas como nas masculinas é o cromossoma Z, enquanto o cromossoma sexual W está presente somente nas femininas. Nesse caso, as plantas masculinas são ZZ e as femininas ZW. O uso das letras Z e W é para distinguir do sistema XY. Neste sistema o cromossoma Z é maior e tem mais genes como o cromossoma X (no sistema XY). O cromossoma Z aparece semelhante ao autossoma nº9 nos humanos, em vez de se parecer com o X ou Y. Isto leva aos investigadores a suporem que estes cromossomas sexuais derivaram de cromossomas autossomáticos de um antepassado comum. Pensa-se que estes autossomas tenham evoluído de um loci determinante sexual que eventualmente desenvolveu-se num cromossoma sexual quando a recombinação entre cromossomas foi suprimida.

Segundo Irish e Nelson (1989) a expressão sexual na planta dióica pode ser genética e ambiental. A determinação do sexo genético pode ser controlada por genes em cromossomas heteromórficos, de locus único ou múltiplos locos em autossomas.

Parker (1990) descreveu que os cromossomas sexuais heteromórficos raramente são encontrados em plantas angiospérmicas. A determinação cromossômica do fenótipo sexual foi detectada em apenas cinco famílias de plantas dióicas: *Rumex*; *Cannabis*; *Humulus*; *Silene* e *Asparagus*.

Bracale *et al.* (1991) referiram que o *Asparagus officinalis* é uma planta dióica, com sexo determinado por cromossomas sexuais. As plantas masculinas (XY) são o sexo heterogâmico. Além desses cromossomas, existem importantes genes de determinação sexual. Existem outros genes que podem influenciar o estágio de degeneração do estilete na planta (Peirce e Currence, 1962; Franken 1970).

Parker e Clark (1991) observaram que na planta *Rumex acetosa*, ao contrário do que acontece na planta *Silene*, o rácio entre o cromossoma X e os autossomas (X:A) parece controlar a determinação do sexo. As plantas femininas são XX e as masculinas XY₁Y₂ ($2n = 14$ e $2n = 15$ respectivamente); no entanto, as plantas diploides com genótipos XXY e XXY₁Y₂ são plantas femininas férteis. Em poliploides, uma proporção de X para autossoma igual a 1,0 ou superior é do sexo feminino; o rácio entre o cromossoma X e autossomas igual a 0,5 ou menor são do sexo masculino. As plantas hermafroditas resultam em proporções entre cromossoma X e autossomas entre 0,5 e 1,0.

Ainsworth *et al.* (1995) descreveram também que o sexo de *Rumex acetosa* é influenciado por um mecanismo de compensação baseado na razão entre o cromossoma X e os autossomas. A diferenciação sexual é frequentemente alcançada pela supressão do desenvolvimento de um conjunto de órgãos sexuais (Ainsworth, 2000; Negrutiu *et al.*, 2001).

Lou *et al.* (2002) referiram que um dos sexos, geralmente o masculino, é heterogâmico, produzindo dois tipos de gametas e apresentando fatores masculinos ou femininos. A feminina, é homogâmica e dá origem a apenas um tipo de gameta que carrega os fatores femininos da planta.

Liu *et al.* (2004) descobriram que a papaia tem um cromossoma Y primitivo, com uma região específica no cromossoma masculino de cerca de 10%, que sofreu várias recombinações, depressões e alterações na sequência de DNA. O estudo indica que pode ser um cromossoma incipiente devido à severa supressão da recombinação e a extensa divergência entre homólogos na região que contém os genes que determinam o sexo na papaia.

Ma *et al.* (2004) descreveram que o sexo na papaia é determinado, não por um gene, mas sim por um grupo complexo de genes que estão confinados a uma pequena região do cromossoma sexual dentro da qual o *crossing over* é impedido. A determinação sexual na papaia é do tipo XX-XY. O genótipo masculino é XY, o feminino XX e o hermafrodita XY2, onde Y2 é o cromossoma Y modificado.

Ming *et al.* (2007) concluíram que, no mapeamento genético da papaia e na sequenciação de amostras da região de não recombinação, a determinação sexual é controlada por um par de cromossomas sexuais primitivos com uma pequena região masculina específica no cromossoma Y. Eles postularam que apenas dois genes são responsáveis pela determinação sexual. Um, é um gene que provoca a feminização da flor pois provoca o aborto estaminal antes ou no início da flor, enquanto o outro, um gene promotor da masculinização provoca a supressão da formação do carpelo (causa o aborto do carpelo em um estágio posterior de desenvolvimento da flor).

Embora tenha sido difícil até agora identificar genes primários determinantes de sexo nas espécies dióicas, uma série de marcadores moleculares ligados ao sexo já foram descobertos. Esses marcadores surgiram de programas de mapeamento genético ou de pesquisas destinadas a encontrar marcadores ligados ao sexo para espécies dióicas de grande importância agronômica (Ainsworth, 2000). Em plantas dióicas cultivadas para a produção de frutas ou sementes, muitas vezes é difícil identificar as plantas femininas num estágio inicial de crescimento da planta. Alguns exemplos são o kiwi (*Actinidia deliciosa*), o lúpulo (*Humulus lupulus*), a tamareira (*Phoenix dactylifera*), a papaia (*Carica papaya*), o pistache (*Pistacia vera*) e a amora-preta (*Rubus chamae-morus*). Os marcadores genéticos mais populares para determinação sexual em plantas dióicas são os RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), os SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), os AFLP (Amplified fragment length polymorphism), os RFLP (Restriction fragment length polymorphism) e os microssatélites.

A determinação sexual também poderá ser devida apenas a um ou mais genes distintos. Por exemplo no caso da espécie *Fragária virginiana*, a determinação do sexo é regulada por dois *loci* que estão ligados um ao outro a uma distância genética de cerca de 5 cM (Spigler *et al.*, 2008). Em *Populus*, o locus determinante de sexo foi localizado no cromossoma 19 (Yin *et al.*, 2008; Pakull *et al.*, 2011).

O sistema de determinação sexual epigenético tem sido documentado em algumas espécies de plantas dióicas (Aryal e Ming, 2013; Korpelainen, 1998; Milewicz e Sawicki, 2012; Pannel, 1997; Spielman *et al.*, 2001; Takagi e Togashi, 2012; Vyskot *et al.*, 1993). Esse tipo de herança sexual é regulado pela ativação de determinados genes (mesmo sem alterar as sequências de DNA) ao nível da transcrição ou pós-transcrição sob a influência de vários determinantes ambientais e fisiológicos (Aryal e Ming 2013). Este mecanismo ocorre através da alteração na estrutura da eucromatina, da metilação do DNA e da inserção de transposões no genoma (Aryal e Ming, 2013; Milewicz e Sawicki 2012; Slotkin e Martienssen, 2007; Vyskot *et al.*, 1993; Weil e Martienssen, 2008).

Existe também, nas plantas dióicas, uma elevada probabilidade da expressão sexual ser influenciada e alterada por hormonas produzidas pela planta. Diferentes tipos de hormonas, como auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, etc., têm se mostrado responsáveis pela regulação da determinação sexual em plantas dióicas (Dellaporta e Calderon-Urrea, 1993; Dauphin-Guernin *et al.*, 1980, Grant *et al.*, 1994, Irish e Nelson, 1989, Jaiswal *et al.*, 1985).

Matsunaga e Kawano (2001) dividiram as plantas dióicas em três classes baseadas no estágio

de desenvolvimento em que as diferenças entre os sexos podem ser detectadas: (a) as plantas cujos botões florais raramente formam os primórdios do sexo oposto, como na planta *Cannabis sativa*, *Humulus species* e *Spinacia oleracea*. (b) as plantas em que o desenvolvimento de sexo oposto é iniciado, mas depois interrompido nos estágios iniciais, como é observado na planta *S. latifolia* (Grant *et al.*, 1994), *R. acetosa* (Ainsworth *et al.*, 1995, 1998) e *Pistacia vera* (Hormaza e Polito 1996) e (c) nas plantas em que o desenvolvimento de órgãos do sexo oposto é interrompido em estágios tardios como na planta *Actinidia deliciosa* (Schmid 1978) e *A. officinalis* (Caporali *et al.*, 1994; Galli *et al.*, 1993).

Na maioria dos casos, excepto na *Salix viminalis* e *Actinidia*, os marcadores ligados ao sexo têm sido associados à identificação das plantas masculinas. Nos casos em que existe um sistema de cromossomas sexuais, é muito mais provável que se encontre um gene determinante e que este esteja relacionado com a masculinidade da planta. Em plantas como *Silene latifolia*, *Cannabis sativa*, *Phoenix dactylifera* e *Rumex acetosa*, portanto, não é surpreendente que os marcadores associados à masculinidade sejam frequentes.

A existência de marcadores moleculares associados ao sexo feminino foram descritos na espécie *Actinidia* (Harvey *et al.*, 1997b) e *Salix viminalis* (Alstrom-Rapaport *et al.*, 1998). Estes podem surgir como consequência de uma ligação estreita com um gene de determinação do sexo feminino ou podem indicar uma sequência no cromossoma X herdada do progenitor masculino.

Partindo dos indivíduos hermafroditas, a evolução dos dois sexos deve geralmente exigir pelo menos duas mudanças genéticas, uma (esterilidade masculina) criando plantas femininas e a outra (esterilidade feminina) produzindo plantas masculinas (Charlesworth e Charlesworth, 1978).

Diferenças nas características morfológicas têm sido observadas nas plantas masculinas e femininas de diferentes espécies dióicas. A possibilidade de usar características morfológicas como marcadores sexuais foi já muito investigada.

Lacombe (1980) observou diferença significativa no comprimento entre nós da planta e taxa de crescimento das plantas femininas e masculinas de cânhamo dioico *Cannabis sativa*. Ele referiu que o sexo das plantas pode ser determinado com a idade de 15 dias, com base nas características vegetativas iniciais.

Chen *et al.* (1985) referiram 100% de correlação entre o sexo e a relação comprimento/largura das folhas de Jojoba. Observou ainda, que a relação comprimento/largura de todas as plantas femininas era maior que a das plantas masculinas.

Oyama (1990) relatou que na planta dióica *Chamaedorea tapingelute*, as plantas masculinas apresentaram variação espacial na taxa de crescimento, mas tal não acontecia com as femininas. Ambos os sexos apresentaram diferentes taxas de produção de folhas ao longo dos anos. As plantas masculinas produziram significativamente mais inflorescências do que as femininas.

Kohorn (1994) observou que na planta Jojoba, *Simmondsia chinensis* as plantas femininas tinham folhas maiores e copas mais abertas do que as masculinas.

Machon *et al.* (1995) constataram que na planta *Asparagus officinalis* as masculinas produziam mais caules mas mais finos do que as femininas.

A determinação sexual nas culturas dióicas economicamente importantes apenas pela morfologia externa das suas formas embriogénicas e juvenis é difícil antes do florescimento. Portanto,

um diagnóstico precoce do género é de grande importância nessas culturas comerciais. Para tal, têm vindo a ser desenvolvidos marcadores genéticos que permitem fazer a identificação do género em fases iniciais do desenvolvimento da planta.

Conclui-se assim que a dicotomia floral apresentada em plantas dióicas resulta de uma modificação durante o desenvolvimento de uma flor perfeita pela supressão de um ou mais conjuntos de órgãos.

Apesar dos crescentes esforços de pesquisa em várias espécies de plantas, há relativamente pouca informação disponível sobre a base molecular da determinação sexual. Pouco se sabe sobre o mecanismo de diferenciação sexual da *C. album*. É difícil estimar o número de genes envolvidos, particularmente porque os genes que resultam na supressão de órgãos são pouco prováveis de ser genes primários na determinação sexual.

Apresentamos em seguida um esquema resumido sobre os fatores intervenientes na diferenciação sexual em plantas dióicas (Figura 3).

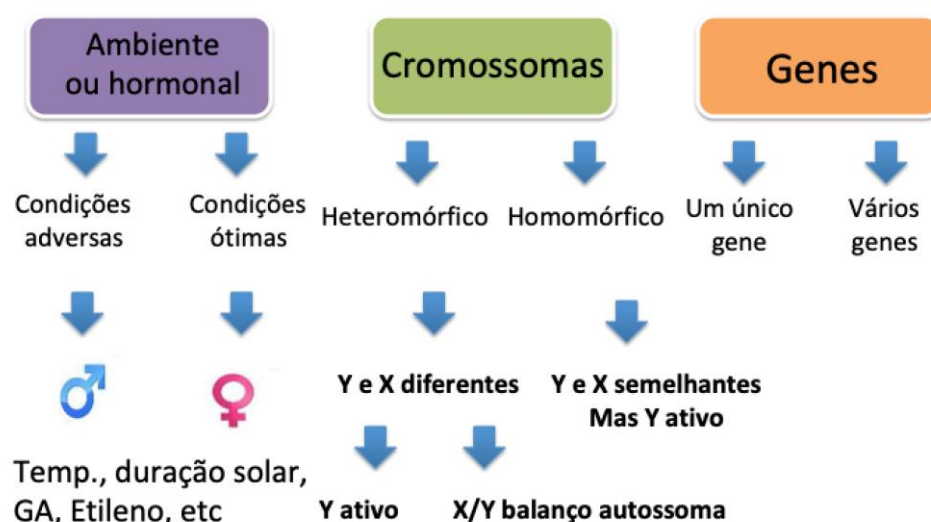


Figura 3 - Esquema resumido sobre a diferenciação sexual em plantas dióicas

2.4 Marcadores moleculares

A detecção de polimorfismos na sequência de DNA que ocorrem naturalmente entre indivíduos e o uso de marcadores moleculares aplicado ao melhoramento de plantas cultivadas representam os principais desenvolvimentos recentes em biologia molecular. A seleção de marcadores moleculares com base no DNA foi acelerada nos últimos anos pelo aparecimento da técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) (Saiki *et al.*, 1988; Mullis *et al.*, 1986). Esta técnica facilitou o desenvolvimento de marcadores genéticos, a identificação de género nas espécies, a clonagem de genes agronomicamente importantes, estudos de variabilidade, a análise filogenética e a seleção assistida por marcadores de fenótipos desejáveis.

A investigação em biologia molecular até meados do século XX era escassa. Os estudos em genética utilizavam marcadores associados a genes relacionados com características morfológicas de fácil visualização (cor das flores, etc.). A maior parte dos marcadores estavam associados a genes com grande importância económica em culturas de grande interesse. Este facto limitou a utilização destes em programas de melhoramento vegetal aliado ao facto de estes marcadores só serem utilizados em culturas modelo tais como ervilha, tomate, milho, etc. (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Seabra, 2001). Não obstante as limitações que tiveram, estes trabalhos também contribuíram de forma significativa para os primeiros estudos em biologia molecular das plantas (mapeamento e análise genética).

Os marcadores moleculares abriram novas oportunidades para estudos de identificação de género na fase inicial da planta. Esses marcadores têm sido usados para identificar o sexo em várias culturas agrícolas importantes, como o pistachio, a canábida, as tamareiras, a papaia, a pimenta e os espargos.

Apesar dos esforços crescentes de pesquisa sobre a aplicação de marcadores sexuais em várias espécies de plantas, há relativamente pouca informação disponível sobre a base molecular da determinação sexual em plantas. Os vários marcadores sexuais, gerados até agora para delinear indivíduos masculinos e femininos, ou vice-versa, numa determinada espécie dióica, no geral não são aplicáveis para distinguir o género noutras espécies.

A pesquisa de marcadores moleculares sexuais abre assim, o caminho para futuras descobertas científicas. Os marcadores sexuais por si só não explicam o mecanismo molecular da determinação sexual em plantas dióicas, mas o número de marcadores, a sua estrutura de sequências e homologia entre sequências características de plantas masculinas e femininas fornecem um ponto de partida no estudo sobre os mecanismos de determinação sexual.

As limitações das metodologias utilizadas no passado (observação morfológicas, bioquímicas e citológicas) para a determinação sexual em plantas dióicas economicamente importantes levaram ao aparecimento de novas estratégias com base em metodologias moleculares. A utilização de técnicas de extração de DNA, utilização de enzimas de restrição/amplificação por PCR, detecção em eletroforese de fragmentos desejados seguido da utilização da técnica de clonagem, sequenciação e estudo em bioinformática são os principais passos na seleção sexual assistida por marcadores.

Os marcadores moleculares correspondem a uma sequência de DNA, aleatória ou não, que correspondem a características específicas de DNA herdadas geneticamente (poderá corresponder a uma zona expressa ou não do DNA) (Ferreira e Grattapaglia, 1995). As técnicas de marcadores moleculares empregues na determinação do sexo podem ser classificadas em duas categorias: (1) marcadores não baseados em PCR (2) marcadores baseados em PCR.

Nesta investigação iremos basear-nos apenas em marcadores que utilizam a técnica da PCR (ou de amplificação de DNA *in vitro*). Em relação a estes marcadores, sabe-se que a invenção da Polymerase Chain Reaction (PCR) em 1983 pelo bioquímico Kary Mullis (Saiki *et al.*, 1985; Erlich *et al.*, 1991) revolucionou toda a metodologia da biologia molecular. Esta técnica permite-nos amplificar qualquer sequência de DNA para um elevado número de cópias. A cópia é realizada através da utilização de *primers* (iniciadores) com sequências arbitrárias ou conhecidas *in vitro*, contornando assim a necessidade de clonagem molecular.

Para a análise de gênero, os testes de marcadores baseados em PCR devem cumprir pelo menos três critérios básicos: (1) amplificação de uma banda (s) específica (s) sexual em todos os indivíduos de um sexo; (2) os fragmentos adicionais devem ser amplificados em todos os indivíduos de ambos os gêneros. Esses fragmentos devem servir como controle positivo e (3) as diferenças de tamanho nos fragmentos amplificados devem ser suficientemente grandes para identificar com segurança o sexo usando géis de agarose padrão e devem expressar sem a necessidade de etapas pós PCR, como a utilização de sequenciação de DNA. Considerando esses critérios básicos, vários marcadores ligados a sexo foram relatados com sucesso em um número considerável de espécies de plantas dióicas, tanto em casos com e sem cromossomas sexuais distintos.

As técnicas baseadas em PCR podem ser subdivididas em duas subcategorias: (1) técnicas baseadas em PCR com marcadores de sequencia arbitrária (2) técnicas que usam marcadores da PCR com uma sequência definida especificamente.

Em relação ao primeiro método, utilizam-se marcadores com uma sequência de DNA arbitrária para amplificar fragmentos de DNA através da técnica da PCR. O uso de marcadores aleatórios superou a limitação do conhecimento prévio da sequência para análise da PCR e facilitou o desenvolvimento de marcadores genéticos para uma variedade de propósitos. Entre os marcadores baseados em *primers* arbitrários, os mais populares são os RAPD (Williams *et al.*, 1990).

Nos vários estudos sobre determinação sexual em plantas dióicas, os marcadores RAPD têm sido o método de escolha mais frequente. É um método simples, barato e não muito demorado. O método RAPD requer amostras de DNA muito menores e é mais fácil de executar do que outros métodos mais antigos como o dos marcadores RFLP usado pela primeira vez por Alec Jeffries em 1984. Apesar da sua alta eficiência, a popularidade do AFLP (Vos *et al.*, 1995) diminuiu gradualmente devido ao alto custo, e às várias fases analíticas demoradas. A grande desvantagem dos marcadores RAPD é a baixa reprodutibilidade, devido à alta sensibilidade a mudanças nas condições de amplificação.

O ISSR é um marcador associado a um método simples e reprodutível que supera muitas das limitações observadas nos marcadores RAPD e AFLP. Os *primers* RAPD e ISSR geram perfis eletroforéticos com um número limitado de bandas, portanto, as análises de polimorfismos que se baseiam nestes métodos podem ser trabalhosas. Sem o fator sorte, dezenas ou até centenas de *primers* precisam ser testados.

Num estudo sobre a determinação sexual em plantas, Ainsworth (2000) observou que a maioria dos investigadores identificou marcadores ligados ao sexo masculino. Esta tendência foi visivelmente invertida nos últimos anos, e o número de espécies onde os marcadores foram encontrados para ambos os sexos continua a aumentar.

Os marcadores sexuais são mais propensos a serem encontrados nos casos em que as plantas têm um sistema de cromossoma sexual a funcionar (Ainsworth, 2000; Korpelainen *et al.*, 2008).

Os marcadores sexuais para ambos os sexos são ainda mais fáceis de identificar em plantas haploides. Em plantas haploides contendo cromossomas sexuais, há até mesmo hipóteses de se poder determinar marcadores masculinos e femininos porque o genoma haploide contém apenas um cromossoma sexual: X ou Y.

Quando os cromossomas heteromórficos estão ausentes e o sexo é determinado por genes em cromossomas autossómicos, significativamente menos marcadores são identificados numa determinada espécie (Ruas *et al.*, 1998).

Num estudo na planta *Pistacia vera*, onde foram utilizados 700 *primers* diferentes de RAPD, apenas um único marcador específico feminino foi encontrado. É bastante provável que nesta planta, apenas um único gene seja responsável pelo mecanismo de determinação sexual (Hormaza *et al.*, 1994).

2.4.1 Marcadores moleculares baseados na amplificação de DNA *in vitro*

A PCR é uma técnica de amplificação extremamente sensível, podendo detetar uma única molécula de DNA numa amostra ou um fragmento contando que no mesmo o alvo esteja presente. Na reação regiões específicas do DNA, são amplificadas enzimaticamente.

Durante a PCR, um segmento específico de ácido desoxirribonucleico (DNA) de cadeia dupla ou simples pode ser amplificado através de sucessivos ciclos.

Para realizar a PCR são necessárias pequenas quantidades do DNA, uma solução tampão salina, a enzima TAQ DNA polimerase, os oligonucleótidos ou iniciadores (*primers*), os quatro desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) e o cofator Mg²⁺.

Esta mistura é colocada num termociclador que faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reacção. Cada ciclo é constituído por desnaturação (quebra de ligações de hidrogénio), emparelhamento dos *primers* e extensão.

Em cada reacção da PCR (na existência de vários ciclos) podem ser produzidas mais de um milhão de cópias num curto espaço de tempo (Mcpherson *et al.*, 1991; Ferreira e Grattapaglia, 1995). São várias as aplicações desta técnica, desde a clonagem até a métodos de diagnóstico genético.

2.4.1.1 Marcadores moleculares baseados na amplificação de DNA *in vitro* usando *primers* RAPD

De entre os vários métodos baseados em DNA, os marcadores derivados da PCR obtidos com *primers* inespecíficos, tornaram-se muito populares para estimar a variabilidade entre espécies.

O DNA com polimorfismos amplificado aleatoriamente (RAPD) é um tipo de marcador baseado numa técnica de mapeamento de DNA usando o método da PCR introduzido por Williams *et al.* (1990). Estes investigadores mostraram que o padrão de bandas amplificadas obtidas num gel de agarose poderia ser usado na caracterização genómica de um determinado indivíduo. Este procedimento detecta polimorfismos na sequência de nucleotídeos do DNA usando um único *primer* de sequência nucleótida aleatória. A amplificação por RAPD realizada em condições semelhantes às da PCR, utiliza DNA genómico das espécies de interesse e um simples e curto oligonucleótido (normalmente um *primer* de 10 pares de bases) com um teor de GC de pelo menos 50%. Os produtos da PCR são separados em géis de agarose e detectados por coloração (com brometo de etídio ou outro colorante apropriado). Em média, cada *primer* dirige a amplificação de vários loci no genoma tornando o ensaio útil para o rastreio eficiente do polimorfismo da sequência de nucleótidos entre indivíduos.

Desta forma a análise por RAPD (Williams *et al.*, 1990) tornou-se uma ferramenta

frequentemente utilizada em estudos de diversidade genética (Huff *et al.*, 1993), na identificação de variedades (Seabra *et al.*, 2001ab) e no mapeamento (Yazdani *et al.*, 1995). A simplicidade da técnica e a sua rapidez na detecção de polimorfismos de marcadores de DNA distribuídos ao longo do genoma são as principais razões da generalização do seu uso.

As temperaturas usadas na técnica da PCR quando se utiliza estes marcadores são baixas (média de 36°C). Cada marcador pode amplificar vários *loci* que vão ser visíveis em várias bandas no gel de eletroforese. Posteriormente, as bandas de cada amostra de DNA (de indivíduos diferentes) são comparadas e definidas as semelhanças e diferenças existentes entre indivíduos da mesma espécie. Estas alterações entre indivíduos podem acontecer por deleções, inserções ou alterações numa única base nucleótida (que impede a ligação do marcador). São visíveis estas diferenças no tamanho das várias bandas formadas no gel de eletroforese.

São várias as vantagens destes marcadores. É um método rápido, simples e barato. É possível realizar a técnica mesmo com pouca quantidade de amostra de DNA e sem ter que se conhecer o genoma da espécie em estudo. São marcadores muito úteis para a elaboração de mapas genéticos (Martin *et al.*, 1993; Yazdani *et al.*, 1995). Estes marcadores apresentam também algumas condicionantes. São marcadores dominantes, logo não é possível a distinção entre indivíduos homozigóticos e heterozigóticos. Pode também acontecer que sequências de DNA diferentes venham a corresponder um número de bases nucleótidas semelhante (mesmo peso molecular). Isto traduz-se em apresentarem bandas no gel de agarose numa localização semelhante. O facto de se proceder à hibridação do DNA a baixas temperaturas durante a técnica da PCR, diminui também a especificidade destes marcadores. São marcadores que apresentam uma baixa reprodutibilidade (Hadrys *et al.*, 1992; Skov, 1998).

A quantidade e qualidade de DNA presente na amostra, a concentração de $MgCl_2$, o tamanho do marcador, a temperatura de ligação utilizada durante a PCR ou mesmo a contaminação da amostra com DNA estranho pode alterar as bandas apresentadas no gel de agarose. O número de bases nucleótidas e a intensidade da amostra pode variar mesmo seguindo o mesmo protocolo de análise com marcadores RAPD (Ellsworth *et al.*, 1993).

A tecnologia RAPD tem sido usada em grande parte para a determinação do sexo em plantas dióicas. O primeiro relatório sobre marcadores RAPDs para determinação sexual foi publicado por Mulcahy *et al.* (1992) na *Silene latifolia* recorrendo ao método de análise BSA. A análise de amostras de DNA utilizando o método BSA (Bulked Segregant Analysis) é um procedimento rápido para identificar marcadores em regiões específicas do genoma e foi descrito primeiramente por Michelmore *et al.* (1991). O método envolve a comparação de dois grupos de amostras de DNA de indivíduos de uma população segregada originada por um único cruzamento. Dentro de cada grupo (pool), os indivíduos são idênticos para um gene específico de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Dois grupos com um gene de interesse diferente são analisados para identificar os marcadores que os distinguem. Os marcadores que são polimórficos entre os vários grupos (pools) estão geneticamente ligados ao *locus* que determina a característica usada para construir esses mesmos grupos (Peters *et al.*, 2003).

Nesse estudo, referido anteriormente, da *S. latifolia* realizado por Mulcahy *et al.* (1992), os

investigadores reuniram DNA genómico de dezoito indivíduos do sexo feminino e dezoito do sexo masculino e analisaram a amostra de DNA masculino e feminino com sessenta *primers* de RAPD. Quatro deles amplificaram um fragmento presente em todas as amostras de plantas masculinas, mas ausente em todas as amostras de plantas femininas. A hipótese de qualquer marcador RAPD ligar-se a um gene ou região genómica de interesse está principalmente dependente do tamanho do genoma, tipo de gene ou região genómica e ainda do tipo de população usada para a análise de marcadores (Harvey *et al.*, 1997a). Depende também, em grande medida, do acaso, porque sequências aleatórias são utilizadas como iniciadores da PCR.

Num outro estudo realizado por Hormaza *et al.* (1994), foram analisados setecentos *primers* RAPD em amostras femininas e masculinas de *Pistacia vera* para identificar um marcador sexual. Apenas um marcador específico do sexo feminino foi encontrado. Polley *et al.* (1997) também utilizou novecentos *primers*, mas apenas três marcadores masculinos específicos foram encontrados em *H. lupulus*. Da mesma forma, em *Calamus simplicifolius*, mil e quarenta *primers* RAPD foram usados tendo apenas sido identificado um marcador específico masculino (Yang *et al.*, 2005). Em *Actinidia delicosa* var. *delicosa*, trinta e quatro *primers* foram testados, desses foram encontrados seis marcadores específicos para as plantas femininas e dois marcadores para as plantas masculinas (Shirkot *et al.*, 2002).

No quadro 1 apresentamos um resumo de vários estudos de diferenciação sexual em plantas dióicas utilizando *primers* RAPD ao longo das últimas duas décadas.

Quadro1- Estudos em diferenciação sexual de várias plantas utilizando marcadores RAPD. F (feminino), M (masculino) e H (hermafrodita)

Espécie vegetal	Nº primers testados	Nº de primers que deram resultados	Código dos primers	Sexo que diferencia	Autores
<i>Silene latifolia</i>	60	4	A3, D5, D12, P8	M	Mulcahy <i>et al.</i> (1992)
<i>Pistichia vera</i>	700	1	OPO 08	F	Hormaza <i>et al.</i> (1994)
<i>Humulus lupulus</i>	900	3	OPJ 09, OPA07, OPU08	M	Polley <i>et al.</i> (1997)
<i>Salix viminalis</i>	380	1	UBC 354	F	Alstrom-Rapaport <i>et al.</i> , 1998
<i>Atriplex garretii</i> (dióica)	158	1	OPAF14	M e H	Ruas <i>et al.</i> (1998)
<i>Actinidia deliciosa</i> var. deliciosa	34	8	OPA01, OPA02, OPA08, OPA11, OPA16, OPB01, OPC05, OPN01	F e M	Shirkot <i>et al.</i> (2002)
<i>Carica papaya</i>	152	1	BC 210	H	Lemos <i>et al.</i> (2002)
<i>Trichosanthes dióica</i>	100 41	1 3	OPC 07, OPC 05, OPC 14 e OPN 01	F e M	Singh <i>et al.</i> (2002) Kumar <i>et al.</i> (2008)
<i>Encephalaris natalensis</i>	140	1	OPD 20	F	Prakash e Staden (2006)
<i>Simmondsia chinensis</i> (jojoba).	72	1	OPG5	F	Agarwal <i>et al.</i> (2007)
<i>Borassus flabellifer</i> L.	180	1	OPA 06	M	George <i>et al.</i> (2007)
<i>Garcilaria changii</i>	69	1	OPA18	M	Sim <i>et al.</i> (2007)
<i>Myristica fragrans</i> (dióica)	60	1	OPE 11	F	Shibu <i>et al.</i> (2008)
<i>Calamus simplicifolius</i>	1040	1	OPS01	M	Yang, H. <i>et al</i> (2005)
<i>Populus tomentosa</i>	88	1	S60	M	Hou <i>et al</i> (2009)
<i>P. dactylifera</i>	30	5	A10, A12, D10; A12, D10	F	Younis <i>et al.</i> (2008)
<i>Asparagus officinalis</i>	760	2	OPC15	M	Jiang <i>et al.</i> (1997)
<i>Simmondsia chinensis</i>	72	1	OPG 05	M	Agrawal <i>et al.</i> (2007)
<i>Simmondsia chinensis</i> cv. Arizona	20	2	F1 e F10	F	Hosseini <i>et al.</i> (2011)
<i>Commiphora wightii</i>	60	3	OPN06, OPA20, OPN 16	F e H	Sanghamitra <i>et al.</i> (2010)
<i>Simarouba glauca</i>	85	5	OPU10 , OPD19 , OPU9, OPS05 e OPW03	M, H, F	Gayatri e G.R Nail (2014)
<i>Pistachia vera</i>	30	1	BC	F	Esfandiyari <i>et al.</i> (2011)
<i>Garcinia indica</i>	92	2	OPW05 e OPW08	F	Thatte <i>et al.</i> (2012)
<i>Cycas circinalis</i>	10	2	OPB01 e OPB05	M e F	Gangopadhyay <i>et al.</i> (2007)
<i>Simarouba glauca</i>	250	1	OPA08	M	Prasanthi. <i>et al.</i> (2010)
<i>Atriplex garretti</i>	158	1	OPAF14	M	Ruas <i>et al.</i> (1998)
<i>Cannabinus sativus</i> L.	20	1	OPA08	M	Mandolino <i>et al.</i> (1999)
<i>Schisandra nigra</i>	120	1	OPA17	M	Jung <i>et al.</i> (2001)
<i>Mercurialis annua</i>	120	2	OPB 01 e OPC 07	M	Khadka <i>et al.</i> (2002)
<i>Carica papaya</i>	32	1	OPY07	M	Chaves e Bedoya (2004)
<i>Pandanus fascicularis</i>	51	1	OPO 08	M	Vinod <i>et al.</i> (2007)

A reprodutibilidade relativamente baixa dos marcadores RAPD, devido à baixa temperatura de hibridação (annealing) e ao uso de *primers* curtos (decâmeros), torna-os pouco confiáveis e menos escolhidos em estudos genômicos (Jones *et al.*, 2009). Apesar disso, os marcadores RAPD têm sido usados com frequência como uma ferramenta para identificar plantas masculinas e femininas em várias espécies dióicas.

2.4.1.2 Marcadores moleculares baseados na amplificação de DNA *in vitro* usando *primers* ISSR

A técnica com marcadores ISSR consiste na amplificação, por PCR, de sequências localizadas entre repetições de microssatélites. Este tipo de marcadores utiliza um maior número de bases nucleótidas do que os marcadores RAPD (utiliza em média 23 bases nucleótidas). O genoma tem um elevado número de sequências repetitivas, portanto o uso deste tipo de marcadores origina vários *loci* (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

O marcador ISSR (Inter simple sequence repeat (Zietkiewicz *et al.*, 1994) é uma técnica baseada na abundância e hipervariabilidade em regiões flanqueadas por DNA microssatélite. Envolve a amplificação por PCR de regiões entre microssatélites adjacentes e inversamente orientados. A técnica utiliza ISSR, com di-, tri-, tetra ou penta-nucleotídeos, geralmente constituídos por 15 a 30 nucleotídeos de comprimento como *primers*. Os *primers* estão ou não ancorados na extremidade 3' ou 5', com 1 a 4 bases degeneradas que se estendem para a região flanqueante, aumentando assim a sua especificidade (Reddy *et al.*, 2002). Os amplicons gerados geralmente têm 200-2000 pb de comprimento que podem ser separados pela técnica de eletroforese. O marcador ISSR dominante adota uma temperatura de “annealing” dos *primers* superior à temperatura usada nos marcadores RAPD, resultando em maior reprodutibilidade dos resultados (das bandas no gel de eletroforese). A análise genética através do uso dos marcadores ISSR tem sido considerada uma técnica eficiente e confiável para a identificação do sexo em várias culturas dióicas.

O marcador de identificação sexual ideal em plantas dióicas deve ser claro, repetível e presente em todos os indivíduos de um determinado sexo, independentemente de sua origem. Ao mesmo tempo, o marcador deve estar ausente em indivíduos do sexo oposto. Para assegurar uma certeza na identificação sexual, é útil ter pelo menos dois marcadores, um para cada sexo. Isso porque a ausência de uma determinada banda pode estar relacionada a erros na amplificação do DNA e não necessariamente à ausência de marcadores.

Tal como os marcadores RAPD, os marcadores ISSR são rápidos e fáceis de manusear. Os marcadores ISSR têm maior reprodutibilidade do que os RAPD devido aos seus *primers* serem mais longos e aplicarem a temperaturas mais altas. Os marcadores ISSR têm, portanto, uma maior especificidade e produzem resultados com uma maior credibilidade.

Têm sido feitos vários estudos de diferenciação sexual com marcadores ISSR em plantas dióicas. Um deles foi feito na planta Jojoba por Kuldeep *et al.* (2008). Um total de quarenta e dois *primers* ISSR foram utilizados em oito cultivares de Jojoba de sexo conhecido para determinar o seu potencial para polimorfismos claros e reprodutibilidade. Dos quarenta e dois *primers* ISSR usados para amplificar o DNA dos indivíduos do sexo masculino e feminino, apenas um *primer*, o UBC-807, mostrou especificidade sexual na análise. O *primer* UBC-807 (5'AGAGAGAGAGAGAGAGT3') produziu um

único fragmento de 1.200 pares de bases no DNA dos indivíduos masculinos, estando esta banda ausente no DNA dos indivíduos femininos. Para confirmar esta observação, este *primer* foi retestado com amostras individuais masculinas e femininas das oito cultivares.

Os marcadores específicos do sexo feminino baseados nos ISSR foram testados em *Calamus tenuis* (Sarmah e Sarma, 2011) e na *Carica papaya* (Gangopadhyay *et al.*, 2007). Vários marcadores ISSR específicos para o sexo masculino também foram relatados em diferentes culturas dióicas como: *Carica papaya* (Parasnis *et al.*, 1999 e Da Costa *et al.*, 2011); *H. japónicas* (Aleksandrov *et al.*, 2011); *H. lupulus* (Danilova *et al.*, 2006); *P. dactylifera* (Younis *et al.*, 2008); *S. chinensis* (Sharma, *et al.*, 2008) e *T. dióica* (Nanda *et al.*, 2013 e Adhikari *et al.*, 2014).

Num outro estudo de Thatte *et al.* (2012) sobre determinação sexual na planta *Garcinia indica* foram testados 28 *primers* ISSR. Neste estudo, apenas um *primer* ISSR (UBC-881) produziu uma banda polimórfica nos indivíduos do sexo masculino.

A probabilidade de encontrar marcadores ligados ao sexo em plantas dióicas depende do tamanho do genoma. Quanto maior o genoma, maior o número de *primers* aleatórios que devem ser selecionados de forma a encontrar um marcador sexual (Jiang *et al.*, 2003).

Num estudo recente de Marcin Zarek (2016), realizado para identificar um marcador sexual na *Taxus baccata*, os investigadores depararam-se com a situação de que alguns indivíduos tinham tantas "flores" masculinas quanto femininas, tal como acontece na *C. album*. Indivíduos hermafroditas podem ser encontrados com muitas flores masculinas e apenas algumas flores femininas ou, às vezes, com números iguais de flores masculinas e femininas dispersas na coroa de toda a árvore (Iszkulo e Jasinska, 2004). Tal facto pode ser provocado por alguma instabilidade, ainda não identificada especificamente, no processo molecular de determinação sexual.

Segundo Gschwend *et al.* (2012), espécies com mecanismos de determinação sexual autossómica podem, em algumas situações, criar as mutações que causam um regresso ao estágio masculino. As espécies que formam cromossomas sexuais permanecem dióicas enquanto esses cromossomas existirem. Por sua vez, segundo Ray Ming *et al.* (2011), todas as espécies dióicas podem potencialmente criar cromossomas sexuais e também transformar-se de plantas dióicas em monoicas, especialmente nos estágios iniciais da evolução dos cromossomas sexuais.

A utilização deste tipo de marcadores moleculares (RAPD e ISSR), pode oferecer uma ferramenta confiável para a determinação precoce do sexo em plantas dióicas antes de entrarem no estágio reprodutivo. Os estudos efectuados com estes marcadores podem também fornecer informação inicial de como se processa ao nível molecular a diferenciação sexual em plantas dióicas.

2.5 Os genes relacionados com o dimorfismo sexual no caso da planta *Diospyros kaki* e *Vitis vinifera ssp. vinifera*.

A sexualidade numa espécie diploide de *Diospyros*, *Diospyros lótus*, mostrou recentemente ser controlada por um sistema cromossómico XY, com um cromossoma Y ativo (Akagi *et al.* 2014b). Adicionalmente, foi descoberto que um gene (OGI) determinante sexual encontra-se localizado no cromossoma Y. Este gene determina a masculinidade na planta *Diospyros lótus* e noutras espécies de

Diospyros (Akagi *et al.*, 2014a). O gene OGI codifica um pequeno RNA que, por sua vez, desencadeia a ação de um RNAi transitivo que irá silenciar um gene feminilizante da planta, o gene MeGI, localizado num autossoma ou numa região pseudo-autossômica do cromossoma sexual. Na ausência do gene OGI (em plantas femininas), o gene MeGI não é silenciado e as características femininas são desenvolvidas (Ping-Xiang Zhang *et al.*, 2016). Os marcadores moleculares desenvolvidos a partir das regiões supostamente flanqueadoras do gene OGI mostraram ser aplicáveis para o marcador molecular de masculinidade em *Diospyro kaki* (o dióspiro comercial), indicando que o controle genético da expressão de masculinidade em *Diospyro kaki* é baseado no sistema OGI / MeGI (Kajita *et al.*, 2015).

No estudo realizado por Ping-Xian Zangh *et al.* (2016) foram utilizados os *primers* do gene OGI *Forward* (5'-CACAGTAGTCATATATTTTACG-3') e OGI *Reverse* (5'-CTGGCACACAAAATATTTTACACCCT-3') utilizados e descritos por Akagi *et al.* (2014a).

O que foi observado neste estudo de Ping-Xian *et al.* (2016) foi a presença do gene OGI em indivíduos com estruturas estaminadas (plantas masculinas) e a ausência do gene nos indivíduos com estruturas pistiladas (plantas femininas).

A planta *Vitis vinifera ssp. vinifera* é uma subespécie hermafrodita. A sua ancestral, a *Vitis vinifera ssp. sylvestris*, é uma planta dióica. Foram identificados no estudo de João *et al.* (2017) dois genes que permitem a distinção entre plantas de *Vitis vinifera* masculinas, femininas e hermafroditas. A região do locus destes genes sexuais é no cromossoma 2. Esta zona no cromossoma 2 foi rastreada, resultando na descoberta do gene VviFSEX. O mesmo rastreamento revelou outro gene, o VviAPRT3 que é também usado como marcador sexual. Ambos os genes permitirem a diferenciação sexual da videira. A expressão do gene VviFSEX é detectada em pétalas, estames e primórdios de carpelos de todos os tipos de flores. As plantas femininas exibem um único alelo para este gene, enquanto as plantas masculinas e hermafroditas exibem dois alelos. Por outro lado, a expressão específica do gene VviAPRT3 no carpelo primordial de plantas masculinas sugere um possível papel no aborto de estruturas femininas da planta (como o pistilo).

Na videira, o locus sexual responsável pelo dimorfismo sexual foi identificado em estudos anteriores de mapeamento genético (Dalbó *et al.*, 2000; Riaz *et al.*, 2006; Marguerit *et al.*, 2009) e está localizado próximo ao marcador genético VviS3 (Dalbó *et al.*, 2000) no cromossoma 21. O marcador genético VviB23, que foi usado essencialmente no mapeamento de populações, também está associado ao locus sexual (Riaz *et al.*, 2006). Mais recentemente, uma região de 143 kb no cromossoma 2, entre 4.907.434 e 5.050.616 pb, foi identificada como responsável pela especificação sexual em *Vitis vinifera ssp. vinifera* (Fechter *et al.*, 2012). Nessa zona apenas um deles, o gene VviAPRT3, foi identificado como diferenciador sexual das plantas femininas das masculinas/hermafroditas (Fechter *et al.*, 2012).

O gene VIT_202s0154g00200, aqui referido como VviFSEX, foi identificado no genoma de *Vitis vinifera ssp. vinifera*, na anotação de sequenciação 12x versão v2.1 (VIT_2), no cromossoma 2 (02) com a estrutura s0154g e recebeu o número de gene 00200.

Este trabalho de investigação na *Vitis vinifera* de João *et al.* (2017) sugerem que o gene VviAPRT3 possa ser o ator principal na especificação do sexo masculino. A presença de transcritos codificados pelo gene VviAPRT3 nos primórdios da formação do carpelo em plantas masculinas, indica

uma possível função de suspensão do desenvolvimento desse órgão em flores masculinas. A sua função nas flores masculinas não é clara. No entanto, a ausência da sua expressão nas flores femininas e hermafroditas, exclui a hipótese de ter um papel no desenvolvimento das anteras, uma vez que sua presença seria necessária em flores hermafroditas para um desenvolvimento adequado do estame. Na presente investigação iremos desenhar os *primers forward* e *reverse* específicos para os genes VviAPRT3 e VviFSEX. Esses *primers* irão ser utilizados numa primeira fase na espécie *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* para validação da sua funcionalidade. Posteriormente, os mesmos *primers* serão utilizados na espécie *Coccoloba album*, simultaneamente em plantas femininas e masculinas de forma a verificar se permitem a distinção sexual entre elas.

3 Material e Métodos

3.1 Análise molecular de genótipos de *Corema album* com marcadores ISSR e RAPD

A primeira parte da investigação decorreu no laboratório de Genética Molecular do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV I.P.) em Oeiras, sob a orientação da Doutora Isabel Evaristo durante os meses de maio e junho de 2017. A segunda etapa do trabalho foi realizada nos laboratórios do Instituto Superior de Agronomia, seção de Horticultura com a orientação da Doutora Mariana Mota durante os meses de fevereiro a dezembro de 2018.

3.1.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado neste estudo refere-se a 18 genótipos de *C. album* de três diferentes proveniências. Entre 2016 e 2017, durante o período da floração foram colhidas folhas frescas de *C. album* em nove plantas adultas masculinas e em nove plantas adultas femininas numa população original localizada na região da Praia do Meco e na Herdade Experimental da Fataca localizada no litoral alentejano, onde se encontram implementadas estas proveniências. (Figura 4 e Quadro 2).

Após a colheita as amostras de folhas foram imediatamente transportadas para o laboratório e adequadamente congeladas a -80°C até ao momento da extração do DNA.



Figura 4- Aspeto geral do ensaio de plantações de *Corema album* instalado na Herdade Experimental da Fataca localizado na região de Odemira. (Cortesia de Teresa Valdivieso)

Quadro 2 – Identificação dos genótipos selecionados de *Corema album* e respetivo local de colheita

Genótipos	Local de colheita	Tipo de sexo (M/F)
M1 (Meco)	Praia do Meco	M
M2 (Meco)	Praia do Meco	M
M3 (Meco)	Praia do Meco	M
M4 (Meco)	Praia do Meco	M
M5 (Meco)	Praia do Meco	M
M6 (Meco)	Praia do Meco	M
M7 (Meco)	Praia do Meco	M
Q2 (Quiaios)	Herdade Experimental Fataca	M
VR10 (Vila Real de Santo António)	Herdade Experimental Fataca	M
F1 (Meco)	Praia do Meco	F
F2 (Meco)	Praia do Meco	F
F3 (Meco)	Praia do Meco	F
F4 (Meco)	Praia do Meco	F
F5 (Meco)	Praia do Meco	F
F8 (Meco)	Praia do Meco	F
F9 (Meco)	Praia do Meco	F
Q8 (Quiaios)	Herdade Experimental Fataca	F
VR9 (Vila Real de Santo António)	Herdade Experimental Fataca	F

3.1.2 Extração de DNA de *Corema album*

Cerca de 100 mg de folhas de camarinhas foram maceradas num almofariz com azoto líquido até ficarem reduzidas a pó e, posteriormente, colocadas em *eppendorfs* previamente etiquetados com o código de referência de cada amostra.

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo do Kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Hilden, Germany) com algumas alterações (aumento da velocidade e tempo de centrifugação durante as etapas de lavagem do DNA e eluição deste em menor volume de solução de TE) que permitiram aumentar não só a qualidade do DNA extraído como também o rendimento das extrações.

As amostras *stock* de DNA foram conservadas a -20°C. Após o processo de extração procedeu-se à quantificação, para verificação da quantidade e qualidade do DNA obtido, para uma boa eficiência da reação da PCR.

3.1.2.1 Determinação da concentração de DNA das amostras de *Corema album* por espectrofotometria

A concentração de DNA pode ser determinada por leitura num espectrofotómetro da absorvência das amostras a 260 nm e 280 nm. A razão entre a $A_{260\text{nm}}$ e $A_{280\text{nm}}$ pode dar-nos uma estimativa do grau de pureza do ácido nucleico e se o valor desta razão for de 1,8 pode considerar-se que o DNA da amostra é puro (Sambrook *et al.*, 1989). No caso da amostra de DNA se apresentar pura, a determinação espectrofotométrica da quantidade de radiação ultravioleta, absorvida pelas bases, torna-se simples e precisa. No entanto, se eventualmente a amostra de DNA ou RNA for muito pequena e apresentar quantidades significativas de impurezas, a quantidade de DNA terá de ser calculada através da intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio, por comparação visual de cada amostra com um marcador de DNA de concentração conhecida após eletroforese em gel de agarose (Storchová, *et al.*, 2000).

3.1.2.2 Teste da qualidade das amostras de DNA da *Corema album* por eletroforese

Após a extração do DNA total, a sua concentração e grau de pureza foram também confirmados através de um gel de agarose a 0,8% por comparação com marcadores de concentração conhecida (λ DNA/HindIII+ EcoRI GibcoBRL Life Technologies). A eletroforese ocorreu durante 30 minutos, utilizando uma voltagem de 80 V.

3.1.3 Amplificação das amostras por PCR com *primers* ISSR

As reações de amplificação por PCR foram realizadas num termociclador Biometra TGradient (Biometra, Göttingen, Germany) com os *primers* ISSR seguindo o protocolo de Zietkiewicz *et al.* 1994). Para um volume total de 25 μ L, utilizou-se 15 μ L de H_2O ; 5 μ L de Go Taq Buffer (5X tampão); 1 μ L de *Primer* (10 picomoles/ μ L); 2 μ L de MgCl_2 (25 mM); 0,25 μ L de dNTPs (20 mM); 0,25 μ L de Go Taq polymerase (Promega) 5 U/ μ L; 0,5 μ L de BSA (20mg/ml) e 1 μ L de DNA (10ng). As amplificações ocorreram de acordo com as condições abaixo referidas (Quadro 3). As reações foram repetidas em alguns *primers* para que a reprodutibilidade dos resultados fosse garantida. Para afastar a hipótese de contaminação das análises de ISSR efectuadas, foi feito um controlo negativo para cada reação da PCR (não inclui DNA da amostra).

O programa da PCR utilizado para os diversos *primers*:

1. Um primeiro ciclo de 4 minutos à temperatura de 94°C para promover a desnaturação da dupla cadeia de DNA molde.
2. Quarenta ciclos com as seguintes etapas: 30 segundos à temperatura de 94°C para desnaturação; 45 segundos à temperatura de 47°C a 57°C (conforme o *primer*) para emparelhamento dos *primers* e um ciclo de 2 minutos à temperatura 72 °C para extensão do *primer*.
3. Um último ciclo com a duração de 7 minutos à temperatura de 72°C para ocorrer a extensão final de todas as cadeias simples.

Quadro 3 – Quadro informativo sobre os 24 *primers* utilizados, temperatura de emparelhamento e sequência de nucleótidos.

Temperatura de emparelhamento	Referência e sequência dos <i>primers</i> di, tri, tetra nucleótidos, ancorados na posição 3' ou 5'
52°C	UBC 807 (AG)8T
47°C	UBC 809 (AG)8G
45°C	UBC 815 (CT)8G
52°C	UBC 816 (CA)8T
54°C	UBC 818 (CA)8G
52°C	UBC 825 (AC)8T
49°C e 52°C	UBC 827 (AC)8G
47°C	UBC 829 (TG)8C
45°C e 50°C	UBC 840 (GA)8YT
45°C	UBC 844 (CT)8RC
54°C	UBC 845 (CT)8RG
50°C	UBC 846 (CA)8RT
54°C	UBC 848 (CA)8RG
57°C	UBC 855 (AC)YT
50°C	UBC 858 (TG)8RT
51°C	UBC 863 (AGT)6
45°C	UBC 864 (ATG)6
50°C	UBC 872 (GATA)4
50°C	UBC 873 (GACA)4
50°C	UBC 881 (GGGTG)3
50°C	UBC 889 DBD(AC)7
50°C	UBC 891 HVH(TG)7
50°C	ISSR (TCC)5
53°C	ISSR (CAG)5

Nota: Y= Pirimidina (C/T) R= purina (A ou G), B= (todas menos A) D= (todas menos C) H= (A, C ou T) V= (todas menos T)

3.1.4 Amplificação das amostras por PCR com os *primers* RAPD

O DNA genômico com boa qualidade e isolado a partir de folhas de *C album* foi submetido à técnica da PCR usando marcadores RAPD de acordo com o procedimento descrito por William *et al.*, (1990). Iniciadores decâmeros aleatórios fornecidos pela 'Operon Technologies' USA com bom poder de resolução foram usados para amplificação do DNA. Da série OPA, OPB, e OPC foram testados no

total quatro *primers* decâmeros: OPA10; OPA13, OPB07 e OPC05 em 14 amostras de DNA genômico de folhas de plantas masculinas (M1; M2; M3; M4; M5; Q2;VR10) e plantas femininas (F1; F2; F3; F4; F5; Q8; VR9) de *C. album*.

As reações de amplificação com PCR foram realizadas usando a GoTaq polimerase da Promega num termociclador Biometra TGradient (Biometra, Göttingen, Germany). Cada reação foi realizada para um volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA; 15 µL de H₂O; 5 µL de Go Taq Buffer (5X tampão); 1 µL de *Primer* (10 picomoles/µL); 2 µL de MgCl₂ (25 mM); 0,25 µL de dNTPs (20 mM); 0,25 µL de Go Taq polymerase enzima (Promega) (5 U/µL); 0,5 µL de BSA (20mg/ml). O programa da PCR utilizado para os quatro *primers* foi semelhante ao já descrito para os ISSR (o mesmo número de 40 ciclos) com variante da temperatura de emparelhamento ter sido de 37°C (Quadro 4).

Quadro 4 – Quadro informativo sobre os quatro *primers* RAPD utilizados, temperatura de emparelhamento e sequência de nucleótidos.

Referência dos <i>primers</i>	Temperatura de emparelhamento	Sequência dos nucleótidos
OPA10	37°C	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA13	37°C	5'-CAGCACCCAC-3'
OPB07	37°C	5'-GGTGACGCAG-3'
OPC05	37°C	5'-GATGACCGCC-3'

3.1.5 Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com *primers* ISSR e *primers* RAPD

Posteriormente, o resultado da reação da PCR foi analisado através de uma eletroforese em gel de agarose a 2% (2g de agarose/100 ml de TBE) com o seguinte procedimento:

1. Adicionou-se a 100 ml de solução tampão TBE (Tris/Borato/EDATA, Invitrogen, Life technologies) (0,5%) 2 gramas de agarose em pó.
2. Aqueceu-se a mistura no microondas durante 2 minutos até a solução começar a ferver e a agarose estar completamente dissolvida.
3. Arrefeceu-se a solução até perto dos 50°C em água fria corrente.
4. Adicionou-se posteriormente à solução do gel o Brometo de Etídio. Diluiu-se por cada 100 ml de solução agarose, 3 µL de Be (0,3 µg/ml)
5. Verteu-se a solução no suporte e colocou-se o pente para fazer os poços para aplicação das amostras.
6. Deixou-se polimerizar, retirou-se o pente e colocou-se o gel na tina (Sub-Cell GT BIO-

RAD). Na tina de eletroforese e na preparação do gel foi usada a mesma solução tampão para evitar pequenas diferenças na força iônica ou no pH que poderão afetar a mobilidade dos fragmentos de DNA (Sambrook e tal., 1989)

7. Aplicaram-se as amostras, ligou-se a fonte de alimentação (Power/Pac 300 da *BIO-RAD*) e iniciou-se a corrida.

Num gel com as dimensões de 15 x 15 cm foram aplicados nos poços do gel 12,5 µL de produto amplificado, juntamente com uma pequena gota de solução *loading buffer* (Bromofenol-2 µL). O *loading buffer* (mistura de 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol dissolvidos em água) serve para aumentar a densidade da amostra e garantir que o DNA mergulhe uniformemente no poço; o facto de adicionar cor à amostra, também, simplifica o processo de aplicação e permite acompanhar o progresso da eletroforese. No gel de agarose também foi colocada uma solução de marcador (Gene Ruler-100 pares de base ou 1kb) para saber o peso correspondente de cada banda (1 µL). A separação eletroforética decorreu a uma voltagem constante de 120 V durante 120 minutos.

Posteriormente, foi feita a visualização dos géis sob luz ultravioleta num sistema de visualização de imagem VersaDoc Gel (Bio-Rad, USA) e a sua imagem integrada para posterior análise. Os tamanhos dos fragmentos visualizados nos géis foram analisados a partir das suas mobilidades relativas às dos fragmentos de tamanho conhecido, os marcadores comerciais utilizados, tendo em conta que a migração é inversamente proporcional ao \log_{10} do número de pares de bases (Nicholl, 1994). Neste estudo não foram considerados para análise fragmentos com amplificação ténue ou *primers* que resultaram em fraca amplificação geral. A reprodutibilidade das bandas foi garantida através da repetição da análise, pelo menos duas vezes, para cada um dos *primers* estudados. Atribuiu-se o mesmo peso molecular às bandas que resultaram da reação com um mesmo *primer* e que apresentaram mobilidade equivalente.

3.1.6 Análise de dados

Os padrões de amplificação dos cinco *primers* ISSR e dos quatro *primers* RAPD selecionados para o estudo de variabilidade genética, obtidos respetivamente para as 18 e 14 amostras em estudo, foram analisados pelo programa *software NTSYSpc, Numerical Taxonomy System Versão 2.2 Windows Xp*. Este *software* pode ser usado para detectar padrões e estruturas em dados multivariados. Pode ser usado, por exemplo, caso se queira descobrir se uma amostra provem de duas ou mais populações distintas ou para estimar uma árvore filogenética usando o método UPGMA para a construção de um dendrograma. O input pode ser informação descritiva de objetos ou medições de semelhanças ou diferenças entre vários objetos de análise.

Para análise dos dados obtidos com as imagens dos resultados da eletroforese, a cada banda com mobilidade eletroforética diferente foi atribuída a um número de posição (nº de banda) e um valor de 1 ou 0 com base na presença ou ausência da banda. Apenas bandas reprodutíveis foram consideradas na análise. Bandas comuns a todas as amostras foram excluídas da análise. As amostras

foram agrupadas com base nos seus perfis em um dendrograma construído com Taxonomia Numérica e Sistema de Análise Multivariada (NTSYSpc-Versão 2.02), utilizando o coeficiente DICE e o método NJ. Além da análise de cluster NJ, o método das médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) foi executado nos mesmos conjuntos de dados. A fim de estimar a qualidade do ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma, o coeficiente de correlação cofenético foi calculado usando o mesmo software NTSYS para PC.

No primeiro passo do tratamento de géis ajustou-se uma linha recta a cada linha à qual está associado um perfil densitométrico (nº de pares de bases). Para avaliar as relações de semelhança entre as amostras analisadas consideraram-se os dados do ponto de vista qualitativo (presença/ausência de bandas). Deste modo, obtiveram-se matrizes de dados (0/1, onde 0 é a ausência de bandas e o 1 a presença de bandas). Foi feita uma matriz em Excel para cada marcador selecionado onde foram identificadas no eixo do X as bandas totais presentes no gel e no eixo dos Y as 18/14 amostras testadas (anexos 1 e 2).

A matriz de semelhança, gerada a partir dos valores densitométricos, foi baseada no coeficiente de *DICE* (coeficiente de correlação linear) e permite considerar diferenças de intensidade de amplificação existentes nos perfis ISSR.

Pelo facto de ser impossível exibir uma variável contra mais de outras duas, simultaneamente, num gráfico tridimensional, deverá ser usado um método que comprima toda esta informação, e a represente ao máximo num espaço tridimensional, por forma, que as relações entre indivíduos possam ser analisada. Estes métodos são denominados de aglomeração (análise de *clusters*) e existem vários entre os quais se refere o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average* – Algoritmo de Ligação pela Média não Ponderada) que agrupa as OTUs pela média das semelhanças que exibem entre si, começando pelos dois OTUs de distância menor e os outros vão-se juntando gradualmente. Nos estudos de diversidade genética, este algoritmo é o mais comum (Duarte *et al.*, 1999) e o mais frequentemente utilizado na taxonomia (Tenreiro, 1995). O resultado da aplicação deste método aglomerativo é um dendrograma que não é mais do que uma estrutura ramificada onde os níveis a que se unem os diferentes ramos estão relacionados com os valores de semelhança.

A consistência dos agrupamentos formados foi avaliada através do coeficiente de correlação cofenética (ρ) e expressa a correlação entre os valores de semelhança originais da matriz e os valores de semelhança obtidos a partir do dendrograma. Assim, no programa NTSYSpc foi calculado o coeficiente de correlação cofenética para cada ramo do dendrograma, obtendo-se uma medida efectiva da fiabilidade da representação, de cada sub-agrupamento do dendrograma.

3.2 Análise molecular com *primers* amplificadores de genes discriminadores do sexo: OGI (gene sexual do *Diospyros kaki*); VviAPRT3 e VviFSEX (genes sexuais da *Vitis vinifera*).

3.2.1 Material vegetal

Foram utilizadas folhas da planta *Vitis vinifera* da variedade Macabeu e Moscatel Galega. De cada variedade foram colhidas 6 gramas de folhas verdes. As folhas foram colhidas durante o mês de março de 2018 da plantação de videiras do Instituto Superior de Agronomia.

Foram igualmente utilizadas 6 gramas de folhas de *Diospyros kaki* da variedade de dióspiro mole e duro, colhidas numa plantação em Alpiarça.

3.2.2 Extração e isolamento do DNA das amostras de videira (*Vitis vinifera ssp. vinifera*) e dióspiro (*Diospyros kaki*).

O passo seguinte foi a extracção do DNA das amostras de *Vitis vinifera ssp. vinifera* (uma amostra da casta Macabeu e outra da casta Moscatel Galega) e de uma amostra de *Diospyro kaki* pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1990).

O protocolo de extração de DNA das videiras (casta Macabeu e Moscatel) e de extração do DNA de Dióspiro (duas amostras de dióspiro variedade mole e uma amostra de dióspiro variedade dura) foi semelhante. Foi necessário realizar o protocolo de extração de DNA três vezes na videira devido ao facto da qualidade do DNA nas primeiras extrações não ter sido satisfatória. A extração do DNA do dióspiro só foi necessária realizar uma única vez.

3.2.3 Medição da quantidade e qualidade do DNA no espectrofotómetro

Foi feita a medição em espectrofotómetro Genequant Pro RNA/DNA da quantidade de DNA existente em cada amostra. Foi utilizado 1 µl de DNA diluído em 49 µl de água destilada. Como referência foi utilizada uma solução com 1 µl de TE em 49 µl de água destilada..

3.2.4 Desenho dos *primers* dos genes OGI, VviAPRT3 e VviFSEX

Foi efectuado o desenho de determinados *primers* específicos que distinguem os genes OGI (gene sexual do *Diospyros kaki*), VviFSEX e VviAPRT3 (genes sexuais da planta *Vitis vinifera*). Estes *primers* foram posteriormente, após validação da sua eficácia na planta de origem (videira e dióspiro), utilizados nas amostras femininas e masculinas da *C. album*, de forma a testar a existência de um gene semelhante diferenciador sexual nesta planta. Para fazer o desenho dos *primers* relacionados com os genes VviAPRT3 e VviFSEX referidos no artigo de João *et al.* (2017) foi feito um blast na página web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, da sequência do *primer forward* dos genes referidos (com o intrão incluído). Deu uma homologia que permitiu saber onde o *primer* começa no cromossoma. Selecionou-se a sequência do *primer forward* após o 3º exão. Fez-se a mesma seleção para o *primer reverse* de

cada gene. Dessa forma delimitou-se a sequência que se utilizou para desenhar o *primer*, pois o cromossoma tem muitos genes e queremos ter a certeza que selecionamos o gene correto (neste caso o gene VviAPRT3). No artigo já referido em cima, é mencionado que o produto tem cerca de 600 pares de bases, logo selecionámos a sequência homóloga ao *primer forward* de cada gene e os 1000 pares de base abaixo dessa sequência (faremos a partir do par de base 6601, sendo que a homologia começa no par de base 6632). Copiámos em seguida essa sequência que posteriormente foi colocada no website <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. Das opções apresentadas pelo software escolhemos o *primer* que abrangia com certeza o gene e que começava e acabava com um par de bases favorável (por exemplo ACC e CATTG). Foi feito o mesmo procedimento para os genes VviFSEX (mencionado no mesmo artigo de João *et al*, 2017) e OGI (gene mencionado no artigo de Ping-Xian Zhang *et al*, 2016). Para o gene OGI foram desenhados os *primers forward* (AAGTGGAAGTGGGACGACAC) e o *reverse* (CGAAGCAAGTCGGTCTTTTC). Para o gene VviAPRT3 foram desenhados os *primers forward* (ACCATCCAATCTTTCCTCATT) e *reverse* (GATGAAAAATACCAGGCAGCTT). Por fim para o gene VviFSEX foram desenhados os *primers forward* (TAATCTGCTCACCAAGAAGCAA) e *reverse* (AGTCATGGTAGGACAAGCACCT), (Quadro 5).

Quadro 5- Sequências dos *primers* amplificadores de genes discriminadores do sexo: OGI (gene sexual do *Diospyros kaki*); VviAPRT3 e VviFSEX (genes sexuais da *Vitis vinifera*).

Genes	Primer Forward 5'→3'	Primer Reverse 5'→3'
Gene OGI	AAGTGGAAGTGGGACGACAC	CGAAGCAAGTCGGTCTTTTC
Gene VviAPRT3	ACCATCCAATCTTTCCTCATTG	GATGAAAAATACCAGGCAGCTT
Gene VviFSEX	TAATCTGCTCACCAAGAAGCAA	AGTCATGGTAGGACAAGCACCT

3.2.5 Eletroforese para testar o DNA existente nas amostras de videira (*Vitis vinifera ssp. vinifera*) e de dióspiro (*Diospyro kaki*).

Tanto para as amostras do dióspiro como para as amostras da videira, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (1,2%) (durante 40 minutos a 100 volts) de forma a verificar a qualidade e quantidade de DNA existente na amostra. No gel de eletroforese para cada amostra colocou-se 10 µl de DNA (diluído na leitura do espectrofotómetro de 1 µl de DNA em 49 µl de água destilada) com 2 µl de Bromofenol. Utilizou-se um marcador com 2 µl de Bromofenol, 9 µl de H₂O (purificada) e 1 µl de marcador λ DNA/Eco RI + Hind III (0,5 µg/ µl). Se se verificarem bandas no gel de agarose quando da observação do mesmo com luz ultravioleta, testamos a qualidade e quantidade do DNA existente e avançamos para a etapa seguinte.

3.2.6 Amplificação por PCR das amostras de videira e dióspiro com o primer 18S rRNA

As análises de DNA foram testadas com os *primers* do gene 18S rRNA (*forward* e *reverse*), que constitui uma ferramenta eficaz para controlo interno de uma amostra por ter um nível de expressão constante. O 18S rRNA é muito abundante e amplifica facilmente durante uma reacção da PCR. Para a preparação de cada amostra para a PCR foi colocado (acrescentando 10% dos valores apresentados para cobrir as perdas de solução durante a manipulação dos produtos) 2,5 µl de Solução Buffer DreamTaq; 18,78 µl de H₂O (purificada); 0,5 µl de dNTPs; 0,5 µl do *primer* 18SrRNA (*forward*) e 0,5 µl de *primer* 18SrRNA (*reverse*) e 0,22 µl de Dreamtaq polymerase (Thermo Scientific Germany). A solução foi feita num tubo com os valores totais multiplicados pelo número de amostras. Posteriormente, 24 µl da mistura total foram passados para cada tubo da PCR e acrescentado 1 µl de DNA de cada amostra (diluído de 1:50 como foi referido nos passos anteriores). As sequências de nucleótidos do *primer* 18S rRNA são respetivamente TTGACGGAAGGGCACCACCAG para o *forward* e GCACCACCACCCACGGAATCG para o *reverse*.

As amostras de videira e diospiro foram amplificadas segundo o protocolo da PCR já descrito previamente para os marcadores ISSR mas com uma temperatura de hibridação de 56°C para o marcador 18SrRNA e apenas 35 ciclos.

3.2.7 Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR das amostras de videira e diospiro com o *primer* 18S rRNA

Posteriormente, foi realizada uma eletroforese das amostras amplificadas com a PCR usando o *primer* 18S rRNA em gel de agarose (2%) durante 40 minutos a 100 volts. Em cada poço foi colocado 2µl de Bromofenol com 10 µl de produto da PCR de cada amostra. Como marcador foi utilizado 1 µl de GeneRuler 100 bp. A visualização do gel foi feita na câmara de luz ultravioleta.

3.2.8 Amplificação por PCR das amostras da videira e diospiro com o *primers* VviAPRT3, VviFSEX e OGI.

Em seguida foram testadas as amostras de diospiro e videira com os *primers* específicos dos genes sexuais. Nas amostras de videira (variedades Macabeu e Moscatel) foram testados os *primers* para os genes VviAPRT3 e VviSEX. O protocolo de preparação das amostras antes de serem amplificadas foi semelhante ao protocolo descrito para a preparação das amostras com o *primer* 18SrRNA. Foi feita uma PCR com a temperatura de hibridação de 55°C para ambos os genes da videira. A reacção da PCR para a amplificação do DNA com o *primer* do gene OGI decorreu com uma temperatura de hibridação de 58°C. O número de ciclos foi de 35.

3.2.9 Eletroforese dos produtos da PCR do DNA da videira e diospiro com os *primers* VviAPRT3, VviFSEX e OGI.

O produto da PCR foi testado através de uma eletroforese em gel de agarose (2%) com as mesmas condições anteriormente descritas.

3.2.10 Amplificação por PCR do DNA da *Corema album* com os primers VviAPRT3, VviFSEX e OGI.

Foram testadas as amostras de *C. album* (as 14 amostras utilizadas nos marcadores RAPD) com os primers VviAPRT3, VviFSEX e OGI. Para a preparação de cada amostra para a PCR foi colocado (acrescentando 10% dos valores apresentados para cobrir as perdas de solução durante a manipulação dos produtos) 2,5 µl de Solução Buffer DreamTaq (Fermentas, Thermo Fisher); 18,78 µl de H₂O (purificada); 0,5 µl de dNTPs; 0,5 µl de primers VviAPRT3, VviFSEX e OGI (forward) e 0,5 µl de primers VviAPRT3, VviFSEX e OGI (reverse) e 0,22 µl de DreamTaq polymerase (Fermentas, Thermo Fisher). A solução foi feita num tubo com os valores totais multiplicados pelo número de amostras. Posteriormente, 24 µl da mistura total foram passados para cada tubo da PCR e acrescentado 1 µl de DNA de cada amostra de *C. album*. As condições da PCR foram semelhantes às anteriormente descritas variando a temperatura de hibridação de 55°C utilizada nos primers VviAPRT3, VviFSEX e 58°C no primer OGI. O número de ciclos foi de 35.

3.2.11 Eletroforese dos produtos da PCR do DNA das amostras de *Corema album* com os primers VviAPRT3, VviFSEX e OGI.

Posteriormente, foi realizada uma eletroforese das amostras amplificadas por PCR com o primer 18S rRNA em gel de agarose (2%) durante 40 minutos a 100 volts. Em cada poço foi colocado 2 µl de Bromofenol com 10 µl de produto da PCR de cada amostra. Como marcador foi utilizado 1 µl de GeneRuler 100 bp.

4. Resultados e Discussão

4.1 Análise molecular com marcadores ISSR e RAPD nas amostras de *Corema album*

Foram, pela primeira vez, analisados marcadores moleculares ISSRs e RAPDs em genótipos de camarinhas para identificar o sexo das plantas num estágio inicial de desenvolvimento, por forma a dispensar a espera do período juvenil.

A extração do DNA das amostras de *C. album* pelo método DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) produziu amostras com uma boa concentração de DNA e um bom grau de purificação assegurado pela leitura feita no aparelho de espectrofotometria Nanodrop 2000 (Quadro 6).

Quadro 6- Concentração de DNA das amostras de camarinha determinada no espectrofotometro Nanodrop.

Amostras	Concentração DNA (ng/μl)	Razão 260nm/280nm	Razão 260nm/230nm
M1	6,7	1,95	0,34
M2	5,6	2,13	0,34
M3	7,6	2,21	0,41
M4	6,4	2,04	0,34
M5	7,6	1,9	0,43
M6	6,4	2,08	0,31
M7	8,7	1,83	0,37
Q2	14,4	1,93	0,58
VR10	8,6	2,06	0,37
F1	7,6	2,25	0,35
F2	12,3	1,41	0,47
F3	14,1	2,04	0,47
F4	9,3	2,45	0,39
F5	12,1	2,28	0,43
F8	8,9	2,4	0,38
F9	9,6	2,27	0,37
Q8	20,8	2,02	0,53
VR9	12,2	2,38	0,45

A razão entre absorvência A260nm e absorvência A280nm pode dar-nos uma estimativa do grau de pureza do ácido nucleico e se o valor desta razão for de 1,8 pode considerar-se que o DNA da amostra é puro (Sambrook *et al.*, 1989). Neste caso, como se pode observar no quadro 6, todos os valores desta razão são acima do 1,8, logo, podemos afirmar que todas as amostras apresentam um bom grau de purificação e, portanto, aptas para serem usadas nos passos seguintes.

Para testar a qualidade e quantidade do DNA presente foi igualmente feito um teste em gel de agarose visível na figura 5.

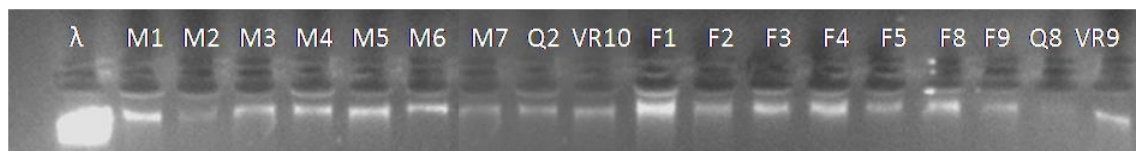


Figura 5 – Gel de agarose de DNA total obtido após extração com DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). A comparação foi feita com o marcador com fragmentos de tamanho conhecido (λ 125 ng. μ l).

4.1.1 Análise Molecular com ISSR

Nos 24 primers ISSR analisados o número de bandas nas amostras femininas e masculinas variou entre oito e 15 e o peso molecular das bandas variou entre 300 e 2000 pb. Doze dos 24 *primers* analisados (AG)8T; (AC)8T; (CA)8G; (CT)8RG; (CA)8RT; (CA)8RG; DBD(AC)7; (GGGTG)3; HVH(TG)7; (TCC)5; (CAG)5; (TG)8RT) mostraram boa amplificação com maior número de bandas bem distintas. Oito não apresentaram amplificação (GA)8YT; (AC)YT; (GACA)4; (CT)8G; (CA)8T; (TG)8C; (AGT)6; (GATA)4) e quatro *primers* (AC)8G; (CT)8RC; (AG)8G; (ATG)6, apresentaram uma amplificação fraca. Contudo, nenhum dos *primers* analisados, apresentou bandas polimórficas que pudessem estar apenas presente num dos sexos e ausente no outro. Subsequentemente, dos doze *primers* amplificados com sucesso, selecionámos cinco, com base no maior polimorfismo, para realizar um estudo de variabilidade genética (Figura 1 e Anexo 1).

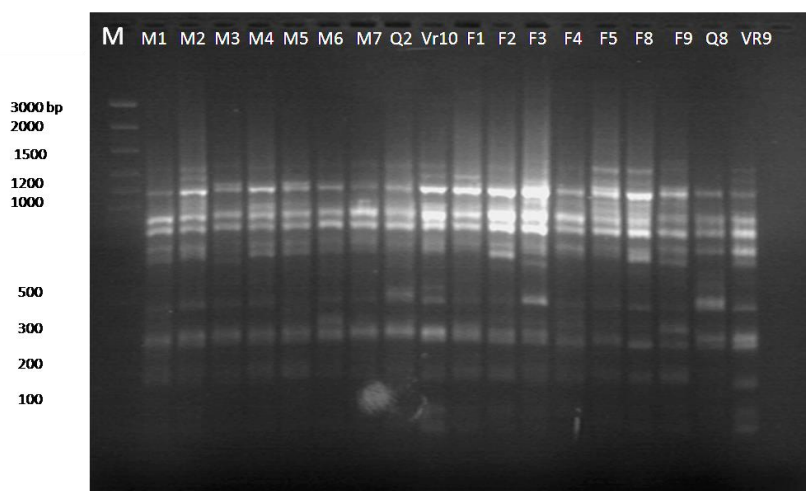


Figura 6 – Gel de agarose dos produtos de amplificação (ISSR) gerados a partir de DNA genómico de 18 amostras de *Corema album* utilizando o oligonucleótido iniciador (*primer*) (AG)8T. M marcador com fragmentos de tamanho conhecido (100-3000 pares de bases).

Os tamanhos dos fragmentos obtidos nas várias amplificações situaram-se entre 300 pb e 3000 pb (pares de bases). Pela análise das imagens dos géis de agarose verificou-se que os cinco *primers* polimórficos estudados originaram 68 bandas de diferente migração. Destas, identificaram-se 44 bandas monomórficas e 24 bandas polimórficas (Quadro1 do Anexo 3). O número de bandas para cada *primer* variou desde 11 a 15. O *primer* (TCC)5 originou um maior número de bandas polimórficas (sete

bandas polimórficas) e o *primer* HVH(TG)7 foi o que originou menor número de bandas polimórficas (apenas quatro).

Com base nos diferentes padrões de bandas observados para os cinco *primers* ISSR selecionados, foi obtido um dendrograma mostrando dois clusters separados. Neste primeiro cluster aparecem 17 amostras num grupo separadas de uma amostra isolada (VR9) com uma percentagem de similaridade de 43%. Dentro da segunda divisão de amostras no primeiro cluster aparecem 6 genótipos e no segundo aparecem 11. Estes dois clusters aparecem separados por uma percentagem de similaridade de 50%. O coeficiente de correlação cofenético desta análise UPGMA foi de 0,713 indicando que o dendrograma permitiu uma representação de ajuste de 71% dos dados originais.

Como podemos ver no dendrograma consenso (Figura 7) as várias amostras femininas e masculinas não apresentam uma tendência para estarem relacionadas geneticamente no fator género. A variabilidade genética apresentada poderá estar relacionada com polimorfismos entre as amostras. Estes também não mostraram estarem relacionados com a proveniência da amostra. No dendrograma podemos ver a amostra F1 (amostra feminina proveniente da Praia do Meco) geneticamente muito relacionada com MVR10 (amostra masculina proveniente de Vila Real de Santo António), ou seja, estas amostras apesar de terem origens geográficas distintas, apresentam uma relação genética próxima.

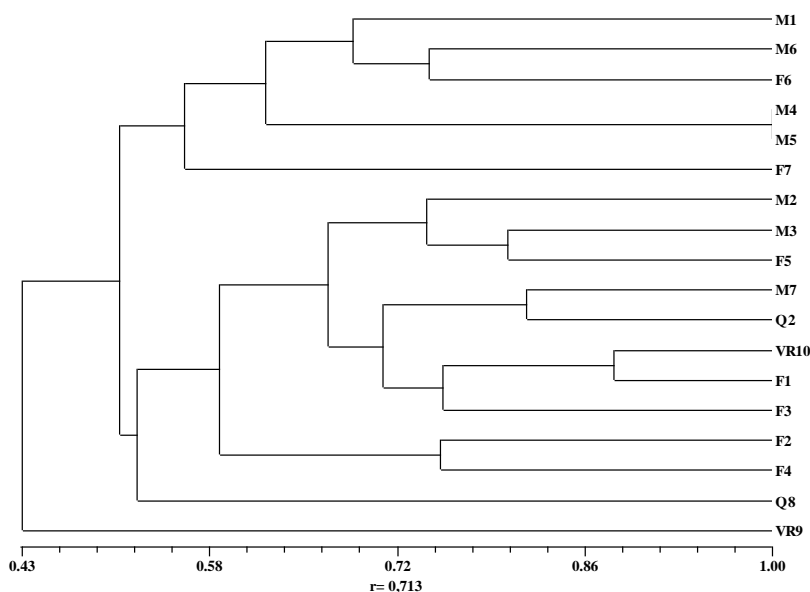


Figura 7 - Dendrograma de consenso obtido com os *primers* ISSR: (TG)8RT; (TCC)5; HVH(TG)7; DBD(AC)7; (AG)8T, analisado no *software* NTSYSpc-Versão 2.02 usando o coeficiente de correlação DICE e UPGMA.

4.1.2 Análise Molecular com RAPD

O DNA genómico de 14 amostras (7 masculinas e 7 femininas) de *C. album* foi igualmente analisado com quatro marcadores RAPD. Os produtos amplificados por PCR com cada *primer* RAPD foram submetidos a uma eletroforese e o gel resultante analisado de forma a detectar polimorfismo entre amostras masculinas e femininas. (Figura 1 e Anexo 2).

O número de bandas nas amostras femininas e masculinas variou entre 10 e 13. O peso molecular de bandas variou entre 250 a 2000 pb. Os quatro *primers* mostraram boa amplificação. Uma amplificação fraca foi obtida na amostra M2 com o *primer* OPA13, na amostra M3 no *primer* OPB7 e nenhuma amplificação com a amostra F2 usando o *primer* OPC5.

Foram produzidas 13 bandas nas amostras masculinas e femininas no *primer* OPA10, nove bandas no *primer* OPA13, 11 bandas no *primer* OPB7 e 10 bandas no *primer* OPC5. O peso molecular dos produtos variou entre 250 e 2000 pb no *primer* OPA10, entre 250 e 2000 pb no *primer* OPA13, entre 250 e 2000 pb no *primer* OPB7 e 300 e 2000 pb no *primer* OPC5. Estes marcadores não produziram uma banda específica masculina ou feminina polimórfica no DNA das 14 amostras. Assim, tal como para os ISSRs, os *primers* RAPDs foram também usados para estimar a variabilidade genética.

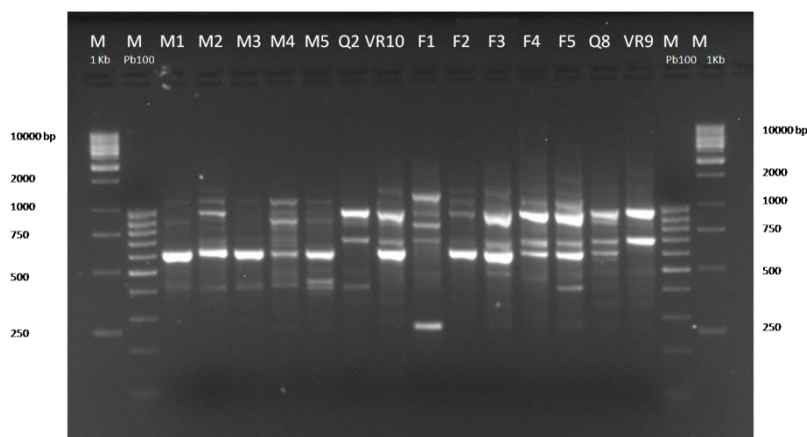


Figura 8 – Gel de agarose dos produtos de amplificação (RAPD) gerados a partir de DNA genómico de 14 amostras de *Corema album* utilizando o oligonucleótido iniciador OPB7 e marcador M com fragmentos de tamanho conhecido (250-10000 pares de bases).

Os tamanhos dos fragmentos obtidos nas várias amplificações situaram-se entre 250 pb e 2000 pb (pares de bases). Pela análise das matrizes de Excel criadas com base na observação dos géis de eletroforese (presença/ausência) verificou-se que os quatro *primers* polimórficos estudados originaram no total 43 bandas de diferente migração. Destas, identificaram-se 24 bandas monomórficas e 19 bandas polimórficas (Quadro 2 do Anexo 3). O número de bandas para cada *primer* variou desde 10 a 13. O *primer* OPA10 originou um maior número de bandas polimórficas (6 bandas polimórficas) e o *primer* OPB7 foi o que originou menor número de bandas polimórficas (apenas 3).

Os padrões de amplificação dos quatro *primers* selecionados para o estudo de variabilidade genética, obtidos para as 14 amostras em estudo, foram igualmente, analisados pelo programa

software *NTSYSpc*, *Numerical Taxonomy System* Versão 2.2 *Windows Xp* usando as mesmas características e métodos já descritos na análise dos marcadores ISSR. No programa *NTSYSpc* foi calculado o coeficiente de correlação cofenética para cada ramo do dendrograma, obtendo-se uma medida efectiva da fiabilidade da representação, de cada sub agrupamento do dendrograma.

Com base nos diferentes perfis de bandas observados para os quatro *primers* RAPD seleccionados, foi obtido um dendrograma mostrando dois clusters separados com uma percentagem de similaridade de 57,8% (Figura 9). No primeiro cluster aparecem seis genótipos (M1, M5, M2, M3, M4 e F1) no segundo aparecem oito genótipos (F2, F4, Q2, VR10, VR9, F3, F5 e Q8). O coeficiente de correlação cofenético desta análise UPGMA foi de 0,741 indicando que o dendrograma permitiu representação de ajuste perto de 75% dos dados originais. Como podemos ver no dendrograma as várias amostras femininas e masculinas não apresentaram uma tendência para estarem relacionadas geneticamente no factor género, em semelhança com o já ocorrido com os marcadores ISSR.

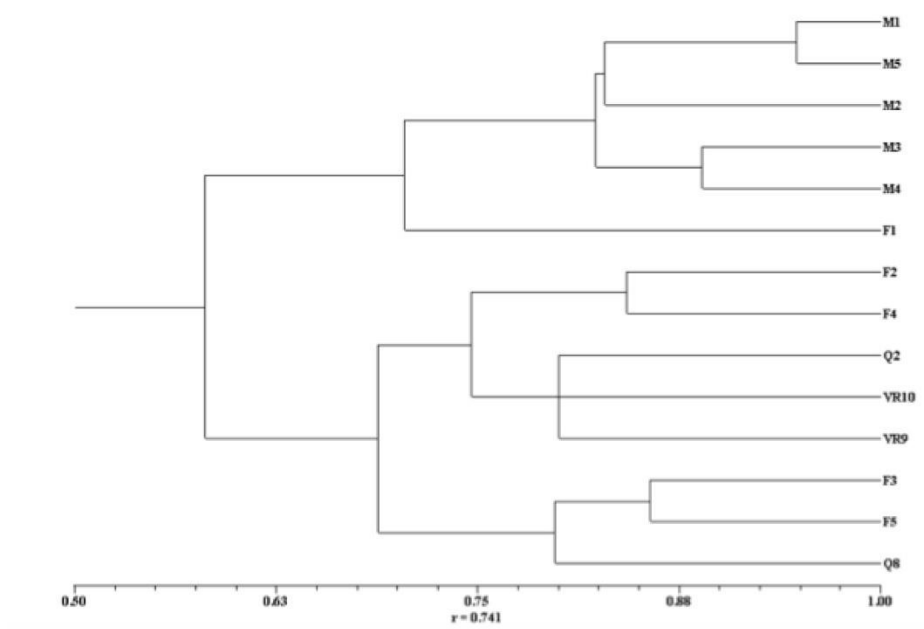


Figura 9 – Dendrograma de consenso obtido com os *primers* RAPD OPA10, OPA13, OPB7 e OPC5, analisado no *software* NTSYSpc-Versão 2.02 usando o coeficiente de correlação DICE e UPGMA.

A variabilidade genética apresentada poderá estar relacionada com polimorfismos entre as amostras. Estes não mostraram também estarem relacionados com a proveniência da amostra. Neste dendrograma podemos ver a amostra Q2 (amostra masculina proveniente de Quiaios) geneticamente relacionada com as amostras VR10 e VR9 (amostra masculina e feminina provenientes de Vila Real de Santo António), ou seja, estas amostras apesar de terem origens geográficas distintas, apresentam uma relação genética próxima.

O que podemos concluir comparando os resultados obtidos com estes dois marcadores são as vantagens demonstradas pelos marcadores ISSR em relação aos marcadores RAPD. Os marcadores

ISSR apresentaram um maior número de bandas nos géis de agarose analisados (um máximo de 15 bandas) do que os marcadores RAPD (que apresentaram no máximo 13 bandas). Tal diferença ainda seria maior caso se tivesse utilizado gel de acrilamida (que permite uma maior visualização da separação entre fragmentos de DNA). Os géis de agarose obtidos com os marcadores RAPD também apresentam maior arrastamento que os géis de ISSR. O facto dos marcadores ISSR serem utilizados a uma temperatura mais elevada permite uma maior especificidade e credibilidade nos resultados apresentados.

Comparando também os dendrogramas obtidos com os dois marcadores, é visível que a análise de dados efectuada com os marcadores ISSR permitiu diferenciar consideravelmente a amostra VR9 do resto das amostras. No dendrograma obtido com os marcadores RAPD, tal diferenciação não foi observada. As temperaturas mais baixas de emparelhamento a que os PCR-RAPD são submetidos, e o facto de o número de pares de bases ser muito inferior (10 pb) aos marcadores ISSR (23 pb) faz com que estes resultados tenham uma baixa reprodutibilidade e desta forma são menos confiáveis nos resultados que apresentam.

4.2 Análise molecular com *primers* amplificadores de genes discriminadores do sexo: VviAPRT3 , VviFSEX (gene sexuais da *Vitis vinifera ssp. vinifera*) e OGI (gene sexual do *Diospyros kaki*).

O DNA genómico das amostras de *Vitis vinifera ssp. vinifera* isolado pelo método modificado CTAB mostrou um grau de contaminação por proteínas e açúcares nas primeiras duas amostras extraídas (valores verificados em espectrofotómetro). A terceira amostra extraída de *Vitis vinifera ssp. vinifera* demonstrou estar contaminada por RNA. A presença de RNA pode interferir nas reacções da PCR precedentes. Assim, o DNA isolado na terceira amostra de DNA extraído das folhas de videira foi purificado com um tratamento utilizando 20 µl RNase. Conseguiu-se obter um DNA de *Diospyros kaki* logo na primeira tentativa sem significativo grau de contaminação (Quadro 7).

Quadro 7 – Concentração de DNA de amostras de Videira e Diospiro determinadas por espectrofotometria.

Amostra	Concentração DNA(ng/µl)	Razão 260nm/280nm	Razão 260nm/230nm
Videira (Macabeu)	1,3150	1,820	2,370
Videira (Moscatel)	34,09	1,805	2,281
Diospiro (Duro)	1489	1,626	1,830
Diospiro (Mole 1)	233,5	1,831	1,776
Diospiro (Mole 2)	1445,5	2,056	1,741

Na eletroforese realizada com o *primer* 18S rRNA foram observadas bandas de DNA nos géis das amostras de videira (tanto na variedade Macabeu como Moscatel) e nas amostras de diospiro (na

amostra de diospiro duro e na amostra de diospiro mole (apenas na segunda amostra desta variedade). Desta forma conseguimos avaliar a qualidade e quantidade de DNA presente.

Foram visualizadas bandas de produto amplificado correspondente a cada gene (413 pb no gene VviFSEX, 611 pb no gene VviAPRT3 e 960 pb no gene OGI) tanto nas amostras de videira (correspondente aos genes VviAPRT3 e VviFSEX) como nas amostras de dióspiro correspondente ao gene OGI (Figura 10).

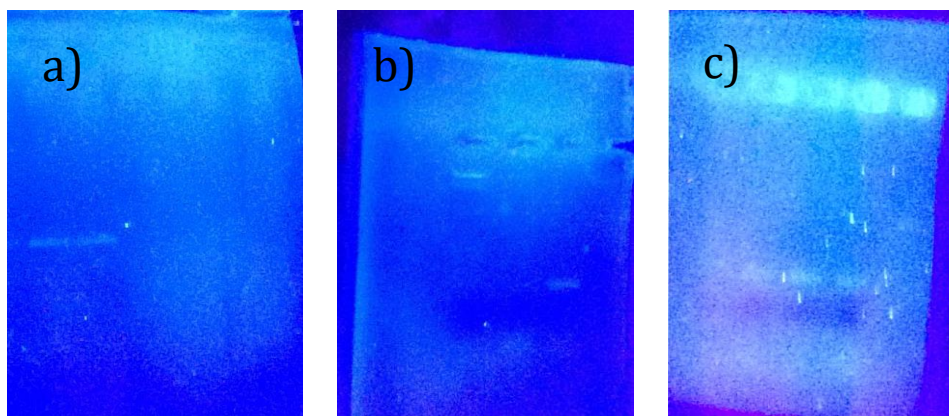


Figura 10 - Imagem de geis de agarose referente a duas amostras de videira: a) amplificadas com o *primer* do gene VviAPRT3; b) amplificadas com o *primer* do gene VviFSEX e c) imagem do gel de agarose referente a três amostras de diospiro amplificadas com o *primer* do gene OGI.

Após a verificação da funcionalidade dos *primers* desenhados especificamente para detectar os genes VviAPRT3, VviFSEX e OIG, respectivamente nas amostras de DNA de videira e diospiro, estes foram testados através do método da PCR nas amostras de DNA de *C. album*. A visualização do gel foi feita na câmara de luz ultravioleta. Não foram observadas quaisquer bandas no gel de agarose (2%) com o produto amplificado dos três *primers* dos genes analisados nas amostras de *C. album*. A causa pela qual não houve amplificação das amostras de *C. album* com os *primers* já referidos não foi determinada. Uma das possibilidades é não existir nenhuma zona no DNA da *C. album* com sequências semelhantes aos *primers* testados e portanto confirmar-se-ia que a *C. album* não tem genes sexuais semelhantes às espécies *Vitis vinifera* e *Diospyros kaki*. Outra possibilidade é ter existido amplificação mas numa quantidade tão pequena que não fosse possível visualizar no gel de eletroforese. A reação da PCR ter sido feita com determinadas condições restritivas, como a temperatura de emparelhamento não ser a adequada ou os reagentes na reacção não estarem na quantidade otimizada (MgCl₂ por exemplo) para funcionarem nas amostras de *C. album*, poderá ter sido outra razão para o resultado obtido. O facto destes *primers* terem amplificado nas amostras de *Vitis vinifera* e *Diospyros kaki* e as amostras de *C. album* terem amplificado com os marcadores RAPD, ISSR e 18S rRNA ou seja, tinham um DNA de boa qualidade presente, leva a supor que a possibilidade de não existir nenhum gene homólogo aos genes sexuais da videira e do dióspiro na *C. album* seja a mais correcta.

5. Considerações Finais

A *C. album* é uma planta com um valor comercial ainda desconhecido pela grande maioria dos mercados que apreciam os pequenos frutos. Os seus frutos têm propriedades oxidativas e são usados na medicina tradicional por algumas comunidades. O facto de ser uma planta dióica é um dos maiores problemas na gestão do seu cultivo. As plantas masculinas e femininas permanecem indistinguíveis até a fase de floração que normalmente ocorre durante alguns anos após o seu plantio. O dioecismo é encontrado em apenas um pequeno número de espécies de plantas. Yampolsky e Yampolsky (1922) observaram que, enquanto apenas 5% das plantas são totalmente dióicas, 75% das famílias de plantas com flores possuem algumas espécies dióicas.

O dioecismo está bem estabelecido nos animais, mas ocorre esporadicamente nas plantas. Charlesworth (1985) atualizou a compilação estabelecida por Yampolsky e Yampolsky (1922) e identificou 1303 géneros e 170 famílias onde o dioecismo está bem estabelecido. O que se sabe hoje é que um conjunto de fatores genéticos e epigenéticos controlam a determinação sexual em plantas dióicas. Estes estudos ainda estão num estágio preliminar. A determinação sexual por cromossomas foi detectada em apenas cinco famílias de plantas dióicas (Parker, 1990). Atualmente, a única opção que existe para ultrapassar o dioecismo na *C. album* é o uso material propagado vegetativamente sabendo previamente o sexo de onde esse material é clonado.

No presente estudo, foi explorada a possibilidade do uso de marcadores moleculares para identificar o sexo no estágio de plântula. O sexo de muitas espécies não pode ser deduzido apenas pela morfologia externa nos estádios iniciais da planta. É o caso da *C. album*. Uma solução eficaz é testar marcadores de DNA para diagnosticar o sexo. Tais marcadores estão presentes no genoma sempre que a determinação do sexo é geneticamente controlada.


Em muitos organismos, a diferenciação sexual é estabelecida pela determinação do sexo por cromossomas. Noutros organismos o sexo pode ser determinado pela presença de um alelo inibidor do desenvolvimento dos órgãos sexuais masculinos. No caso da *C. album* ainda não se sabe ao certo como funciona o seu mecanismo de regulação sexual.

A identificação sexual ao nível do DNA é uma técnica bem estabelecida, rápida e precisa. Requer apenas amostras mínimas de tecido vegetal que pode ser colhido em todos os estágios de crescimento da planta e estação do ano. O DNA extraído pode ser preservado sob condições ambientais por longos períodos antes da análise. O grande desafio é descobrir o marcador molecular que permita distinguir claramente a carácter sexual da planta. Foi esse o desafio que tentamos abraçar com este estudo.

Neste estudo foram testados em 18 amostras de *C. album*, 24 marcadores moleculares ISSR, quatro marcadores RAPD e testados 3 *primers* (VviAPRT3, VviFSEX e OGI) associados a determinação sexual nas plantas da videira e dióspiro. Nenhum dos *primers* testados revelou qualquer polimorfismo entre plantas masculinas e femininas. Julgamos que o universo de *primers* analisado ter sido reduzido comparando com a média de número de *primers* avaliados em outros estudos semelhantes na determinação sexual (onde mais de uma centena de *primers* foram testados de forma a obter um *primer* que dê o resultado procurado). Embora com esta investigação não tenhamos obtido

o resultado estabelecido nos nossos objetivos, ficou o registo dos marcadores moleculares já analisados e que não deram resultados. Em futuras investigações no mesmo âmbito do que foi estudado nesta tese, já não haverá a necessidade de testar novamente estes marcadores. Um caminho a seguir no futuro poderá ser procurar novos genes homólogos discriminantes do sexo em determinadas plantas que possam também existir com essa função na *C. album*. Uma via alternativa poderá ser continuar a testar mais marcadores ISSR para além dos já analisados aqui neste estudo. Outra abordagem interessante será investigar a possibilidade da distinção sexual se processar ao nível da transcrição (RNA) e se tal se verificar, encontrar marcadores moleculares a esse nível que permitam a distinção sexual na *C. album*.

6. Referências Bibliográficas

- Adhikari S., Saha S., Bandyopadhyay T.K., and Ghosh P.D., 2014. Identification and validation of a new male sex-specific ISSR marker in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.). *Sci. World J.* Article ID 216896.
- Agrawal V., Sharma K., Gupta S., Kumar R., Prasad M., 2007. Identification of sex in *Simmondsia chinensis* (Jojoba) using RAPD markers. *Plant Biotech. Rep.* 1:207–210.
- Ainsworth C., Crossley S., and Buchanan V., 1995. Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. *Plant Cell.* 7:1583–1598.
- Ainsworth C., Buchanan-Wollaston V., Parker J., 1998. 5 Sex Determination in Plants in Current Topics in Developmental Biology 38:167-223, February 1998.
- Ainsworth C.C., Lu J., Winfield M., Parker J.S., 1999. Sex determination by X:autosome dosage: *Rumex acetosa* (sorrel). In: Ainsworth CC, ed. Sex determination in plants. Oxford: Bios Scientific Publishers, 121-36.
- Ainsworth Charles, 2000, Boys and Girls Come Out to Play: The Molecular Biology of Dioecious Plants, *Annals of Botany* 86: 211-221.
- Akagi T., I. M. Henery, R. Tao, and L. Comai, 2014a. A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science* 346, 646—650.
- Akagi T., K. Kajita T., Kibe H. Morimura, T. Tsujimoto, S. Nishiyama, T. Kawai, H. Yamane, and R. Tao, 2014b.: Development of molecular markers associated with sexuality in *Diospyros lotus* L. and their application in *D. kaki* Thunb. *J. Japan. Soc. Hortic. Sci.* 83, 214—221.
- Aleksandrov O.S., Divashuk M.G., and Karlov G.I. 2011. Development of a sex-specific molecular marker for Japanese Hop *Humulus japonicus* Siebold & Zucc. *Russ. J. Genet.* , 47: 1016-1020. 
- Alstrom-Rapaport C., Lascoux M., Wang Y.C., Roberts G., Tuskan G. 1998. Identification of RAPD marker linked to sex determination in the basket willow (*Salix viminalis* L.) *J. Hered.* 89:44–49.
- Álvarez-Cansino L., Zunzunegui M., Díaz-Barradas M.C., Esquivias M.P., 2010a. Physiological performance and xylem water isotopic composition underlie gender-specific responses in the dioecious shrub *Corema album*. *Physiologia Plantarum* 140, 32–45.
- Álvarez-Cansino L., Zunzunegui M., Díaz-Barradas M.C., Esquivias M.P. 2010b. Gender-specific costs of reproduction on vegetative growth and physiological performance in the dioecious shrub *Corema album*. *Annals of Botany* 106, 989–998.
- Álvarez-Cansino, Mari Barradas, María Zunzunegui, Mari Paz Esquivias and Todd E. Dawson, 2012. Gender-specific variation in physiology in the dioecious shrub *Corema album* throughout its distributional range, 2012, *Functional Plant Biology* 39, 968-978.
- Anne-Françoise Rocheleau and Gilles Houle, 2001. Different cost of reproduction for the males and females of the rare dioecious shrub *Corema conradii* (Empetraceae), *American Journal of Botany*, volume 88, nº 4, 659-666.

- Aryal R., Ming R., 2013. Sex determination in flowering plants: papaya as a model system. *Plant Sci* 217-218:56-62.
- Blackburn K. B., 1923. Sex chromosomes in plants. *Nature* 112, 687-688.
- Bracale I., Carporali E., Gall M.G., 1991. Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. *Plant Sci.* 80: 67–77.
- Calviño-Cancela M., 2004. Ingestion and dispersal: direct and indirect effects of frugivores on seed viability and germination of *Corema album* (Empetraceae). *Acta Oecologica*, 26 (1), pp.55-64.
- Caporali E., Carboni A., Galli M.G., Rossi G., Spada A., Marziani Longo G.P. 1994. Development of male and female flower in *Asparagus officinalis*. Search for point of transition from hermaphroditic to unisexual developmental pathway. *Sex Plant Reproduction* 7:239–249.
- Charlesworth B., Charlesworth D., 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Nature* 112: 975-997.
- Charlesworth D., 1985. Distribution of dioecy and self-incompatibility in angiosperms. In: Greenwood, P.J. and Slatkin, M. (eds.). *Evolution—Essays in Honour of John Maynard Smith* (1st Ed., 1989). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 237–268.
- Chaves G., and Bedoya V.N., 2004. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. *Theor. Appl. Genet.* 110: 120-126.
- Chen P.K., Fan C.J., O'Brien W. and Venkateswaran S., 1985. Pre flowering sex determination: an aid to Jojoba propagation. *Proceedings of the sixth international conference on Jojoba and its uses*. Ben-Gurion university of Neger: Beersheva. pp 243-251.
- Da Costa F.R., Pereira T.N.S., Gabriel A.P.C., and Pereira M.G., 2011. ISSR markers for genetic relationships in Caricaceae and sex differentiation in papaya. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 11: 352-357.
- Dalbó M. A., Ye G. N., Weeden N. F., Steinkellner H., Sefc, K. M., and Reisch B. I., 2000. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome* 43, 333–340. doi: 10.1139/g99-136
- Danilova T.V., and Karlov G.I., 2006. Applications of intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex specific molecular markers in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 151: 15-21.
- Dauphin-Guerin B., Teller G., Durand B., 1980. Different endogenous cytokinins between male and female *Mercurialis annua* L. *Planta*, 144:124–129
- Dawson T.E. and Ehleringer J.R., 1993. Gender-specific physiology, carbon isotope discrimination, and habitat distribution in boxelder *Acer negundo*. *Ecology*, 74, 798–815.
- Dawson T.E., Bliss L.C., 1989 Patterns of water use and the tissue water relations in the dioecious shrub, *Salix arctica*: the physiological basis for habitat partitioning between the sexes. *Oecologia* 79, 332–343.
- Doyle JJ, Doyle JL., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Duarte M.C., Santos J.B., Melo L.C., 1999. Comparison of similarity coefficients on RAPD markers in the common bean. *Genetics and Molecular Biology*, 22(3), 427-432.

- Ellsworth D.L., Rittenhouse K.D., Honeycutt R.L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques*, 14, 214-217.
- Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J., 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252, 1643-1651.
- Esfandiyari B., Davarynejad G.H., Shahriari F., Kiani M., Maithe, 2011. Data to the sex determination in *Pistacia* species using molecular markers. *Euphytica*, Volume 185, Issue 2, pp 227-231.
- Fechter I., Hausmann L., Daum M., Sörensen T. R., Viehöver P., Weisshaar B., et al. 2012. Candidate genes within a 143 kb region of the flower sex locus in *Vitis*. *Mol. Genet. Genomics* 287, 247–259. doi: 10.1007/s00438-012- 0674-z
- Ferreira M.E., Grattapaglia D., 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília; Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária- MAARA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia-CENARGEN, Brasília, DF.
- Franken, A. 1970. Sex characteristics and inheritance of sex in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Euphytica*. 19: 277–287.
- Galli M.G., Bracale M., Falavigna A., Raffaldi F., Savini C., Vigo A., 1993. Different kinds of male flowers in the dioecious plant *Asparagus officinalis* L. *Sex Plant Reprod* 6:16–21
- Gangopadhyay G., Roy S.K., Ghose K., Poddar R., Bandyopadhyay T., Basu D., and Mukherjee K.K., 2007. Sex detection of *Carica papaya* and *Cycas circinalis* in pre-flowering stage of ISSR and RAPD. *Curr. Sci.* 92: 524-526.
- Gayatri Vaidya and G.R. Nail 2014. Molecular identification of sex in *Simarouba glauca* by RAPD markers for crop improvement strategies, *Biotechnology Reports* 4, 56-59.
- George J., Karun A., Manimekalai R., Rajesh M.K. and Remya P. , 2007. Identification of RAPD markers linked to sex determination in palmyrah (*Borassus flabellifer* L.). *Curtr.Sci.*93 (8): 1075-1077.
- Gonzalez GAL, 2001. Los Arboles y Arbustos de la Peninsula Iberica e Islas Baleares, Mundi-Prensa, Madrid, Spain; 2: p. 1727
- Grant S., Houben A., Vyskot B., Sirikovy J., Pan W.H., Macas J. et al 1994. *Genetics of sex determination in flowering plants*. *Dev Genet* 15: 214–230.
- Gschwend A., Qingyi Yu, Eric J. Tong, Fanchang Zeng, Jennifer Han, Robert VanBuren, Rishi Aryal, Deborah Charlesworth, Paul H. Moore, Andrew H. Paterson, and Ray Ming, 2012. Rapid divergence and expansion of the X chromosome in papaya, PNAS. 109 (34) 13716-13721.
- Guitian P., Medrano M., Rodriguez, 1997. M. Reproductive biology of *Corema album*(L.) D. Don (Empetraceae) in the northwest Iberian Peninsula. *Acta Botanica Gallica*. 144: 119–28.
- Hadrys H., Balick M., Schierwater B.,1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1(1), 55-63.
- Harvey C.F., Gill G.P., Fraser L.G., McNeillage M.A., 1997a. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. *Sexual Plant Reproduction* 10: 149-154

- Harvey, C.F., Fraser, L.G., and Gill, G.P., 1997b. Sex determination in actinidia. *Acta Hort.* 444: 85-88. [13] SEP
- Heikrujam M., Sharma K., Prasad M., and Agrawal V., 2015. Review on different mechanisms of sex determination and sex-linked molecular markers in dioecious crops: a current update. *Euphytica*. 201: 161-194.
- Hellmann C., Sutter R., Rascher K.G., Maguas C., Correia O., Werner C., 2011. Impact of an exotic N₂-fixing *Acacia* on composition and N status of a native Mediterranean community. *Acta Oecologica*. 37: 43–50.
- Hormaza J.I., Dollo L., Polito V.S., 1994. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.* 89:9–13.
- Hormaza J.I., Polito V.S., 1996 Pistillate and staminate flower development in dioecious *Pistacia vera* (Anacardiaceae). *Am J Bot* 83:759–766.
- Hosseini F. S., H. Shahsavand Hassani, M. J. Arvin, A. Baghizadehand G. Mohammadi- Nejad, 2011. Sex determination of jojoba (*Simmondsia chinensis* cv. Arizona) by random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular markers, *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (4), pp. 470-474.
- Hou W., Fan J., Zhou F., and Zhao S., 2009. RAPD markers related to sex locus in *Populus tomentosa*. *Front. For. China*. 4(2): 223–226.
- Huff D.R., Peakall R., Smouse P.E., 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalegrass (*Buchloe daetyloides* (Nutt.) Engalm.) *Theor. Appl. Genet.*, 86, 927-934.
- Hultine K.R., Bush S.E., West A.G. and Ehleringer J.R., 2007. Population structure, physiology and ecohydrological impacts of dioecious riparian tree species of western North America. *Oecologia* 154, 85–93.
- Irish E.E., and Nelson T., 1989. Sex determination in monoecious and dioecious plants. *Plant Cell* 1: 737-744.
- Iszkulo G. and Jasinska A., 2004. Variation in Polish and Ukrainian populations of *Taxus baccata* L., *Dendrobiology*, vol. 42, pp. 29-32.
- Jacobsen P., 1957. The sex chromosomes of *Humulus*. *Hereditas* 43:357-370.
- Jaiswal V.S., Kumar A, Lal M., 1985. Role of endogenous phytohormones and some macromolecules in regulation of sex differentiation in flowering plants. *Proc Indian Acad Sci* 95:453–459.
- Jiang C. and Sink K.C., 1997. RAPD and SCAR Markers Linked to the Sex Expression Locus *M* in *Asparagus*, *Euphytica*, vol. 94, pp. 329–333.
- Jiang N., Bao Z., Zhang X., Hirochika H., Eddy S.R., McCouch S.R., and Wessler S.R., 2003. An active DNA transposon family in rice. *Nature* 421 163–167.
- Jung J.S., Han H.S., Lee K.Y., Bae C.H. and Lee H.Y., 2001. A male associated DNA sequence in a dioecious plant, *Schisandra nigra*. *Breed. Sci.* 51: 219-223.
- João L. Coito, Miguel J.N. Ramos, Jorge Cunha, Helena G. Silva, Sara Amâncio, Maria M.R. Costa and Margarida Rocheta, 2017. *VviAPRT3* and *VviFSEX*: Two Genes Involved in Sex

Specification Able to Distinguish Different Flower Types in *Vitis*, *Frontiers in Plant Science*, Volume 8, Article 98.

- Jones N., Ougham H., Thomas H., and Pasakinskiene I., 2009. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytol.* 183: 935-966.
- Kajita K., T. Akagi, H. Yamane, R. Tao, and K. Yonemori, 2015. The relationship between a maleness-associated region in *Diospyros lotus* L. and maleness of persimmon (*D. kaki* Thunb.) cultivars. *Hortic. Res. (Japan)* 14, 121—126 (in Japanese with English summary).
- Khadka D. K., Nejdat A., Tal M., Golan-Goldhirsh A., 2002. DNA markers for sex: Molecular evidence for gender dimorphism in dioecious *Mercurialis annua* L.. *Molecular Breeding*, December 2002, Volume 9, Issue 4, pp 251-257.
- Kihara H. and Ono T., 1923a. Cytological studies on *Rumex*. I. Chromosomes of *Rumex acetosa*, L. *Bot. Mag. (Tokyo)* 37, 84-90.-and-1923b. Cytological studies on *Rumex*. II. On the relation of chromosome number and sexes in *Rumex acetosa*, L. *ib.* 37, 147-149.
- Kohorn L.B., 1994. Shoot morphology and reproduction in jojoba: advantages of sexual dimorphism. *Ecol.* 75: 2384-2394.
- Korpelainen H., 1998. Labile sex expression in plants. *Biol Rev* 73:157–180
- Korpelainen H., Kostamo K., Karttunen H., Virtanen V. and Pohjamo M., 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci for twenty common bryophyte species. In: H. Mohamed, B.B. Baki, A. Nasrulhaq-Boyce & P.K.Y. Lee, eds. *Bryology in the new millennium*. Kuala Lumpur: University of Malaya, pp. 241–57.
- Kumar S., Singh B.D., Sinha D.P. and Rai M., 2008. Sex expression-associated RAPD markers in pointed gourd (*Trichosanthes dioica*).In: *Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae*. May 21-24. pp.543-550.
- Lacombe J.P., 1980. Sex discrimination from early vegetative characters in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Physiologie Vegetale*. 18: 419 - 430.
- Lemos E.G.M., Cristina Soares, L., Silva P. and Zaidan H.A., 2002. Identification of sex in *Carica papaya* L. using RAPD markers. *Euphytica*. 127:179 –184.
- Liu Z., Moore P.H., Ma H., Ackerman C.M., Ragiba M., Yu Q., Pearl H.M., Kim M.S, Charlton J.W., Stiles J.I., Zhe F.T., Paterson A.H. and Ming R., 2004. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* 427:348-352.
- Lou Q.F., Yu J.Z., and Chen J.F., 2002. Studies on genetic bases and markers of sex differentiation in plants. *Plant Cell*. 19(6): 684 – 691.
- Ma H., Moore P.H., Liu Z., Kim M.S., Yu Q., Fitc, M.M., Sekiota T., Paterson A.H. and Ming R., 2004. High-density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya. *Genetics*166:419 -436
- Machon N., Deleire L.B.V., and Reineav C., 1995. Quantitative analysis of sexual dimorphism in asparagus. *Can. J. Bot.* 73:1780 -1786.
- Maguas C., Rascher K.G., Martins-Loução A, Carvalho P, Pinho P., Ramos M., Correia O., Werner C., 2011. Responses of woody species to spatial and temporal ground water changes in coastal sand dune systems. *Biogeosciences Discussions*. 8:1591–616.

- Mandolino G., Carboni A., Forapani S., Faeti V., and Ranalli P., 1999. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98:86-92.
- Marcin Zarek, 2016. Preliminary studies on the molecular identification of sex in *Taxus baccata* L., Lesne Prace Badawcze / *Forest Research Papers*, Vol. 77 (1):68–75.
- Marguerit E., Boury C., Manicki A., Donnart M., Butterlin G., Némorin A., et al. 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 118, 1261–1278. doi: 10.1007/s00122-009-0979-4.
- Marques E.M.M.S., 2007. Caracterização das populações de Camarinha (*Corema album* L.) no Cabo Carvoeiro. Master's Thesis. Universidade de Lisboa.
- Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chungwongse J., Frary A., Ganai M.W., Spivey R., WU T., Earle E.D., Tanksley S.D., 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato, *Science*, 262, 1432-1436.
- Martine C.T., Lubertazzi D., Dubrul A., 2005. The biology of *Corema conradii*: Natural history, reproduction, and observations of apost-fire seedling recruitment. *Northeastern Naturalist.*; 12: 267–86
- Matsunaga S., Kawano S., 2001. Sex determination by sex chromosomes in dioecious plants. *Plant Biology* 3:481–488
- Mcpherson M.J., Quirke P., Taylor G.R., 1991. *PCR – A practical approach*, vol 1, Oxford University Press.
- Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V., 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations (random amplified polymorphic DNA/restriction fragment length polymorphism). *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9828–9832
- Milewicz M., Sawicki J., 2012 Mechanisms of sex determination in plants. *Cas Slez Muz Opava (A)*. 61:123–129.
- Ming R., Yu Q., and Paul H., 2007. Sex determination in papaya. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 18:401-408.
- Mulcahy D.L., Weeden N.F., Kesseli R., Carroll S.B., 1992. DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sexual Plant Reproduction* 5:86-88.
- Mullis K.B. Faloona F.A. Scharf S., Saiki R., Hurn G. and Erlich E., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Quant. Biol.* 51: 263 - 273.
- Nanda S., Kar B., Nayak S., Jha S. and Joshi R.K., 2013. Development of an ISSR based STS marker for sex identification in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.). *Sci. Hort.* 150: 11-15.
- Negrutiu I., Vyskot B., Barbacar N., Georgiev S., Moneger F., 2001. Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiol* 127:1418–1424
- Nicholl D.S.T., 1994. *An introduction to genetic engineering*. Cambridge University Press. Great Britain.

- Nicotra A.B., Chazdon R.L. and Montgomery R.A., 2003. Sexes show contrasting patterns of leaf and crown carbon gain in a dioecious rainforest shrub. *Am. J. Bot.* 90: 347–355.
- Oliveira P.B. and Dale A., 2012. *Corema album* (L.) D. Don, the white crowberry -a new crop. *Journal of Berry Research.* 2 (3): 123-133.
- Oyama K., 1990. Variation in growth and reproduction in new tropical dioecious palm, *Chamedorea tepejilote*. *J. Ecol.* 78: 648 - 663.
- Pablo Guitián, Mónica Medrano e Mónica Rodríguez, 1997. Reproductive biology of *Corema album* (L.) D. Don (Empetraceae) in the northwest Iberian Peninsula, *Acta Botanica Gallica*, 144:1,119-128, Doi10.1080/12538078.1997.10515759
- Pakull B., Groppe K., Mecucci F., Gaudet M., Sabatti M., Fladung M., 2011. Genetic mapping of linkage group XIX and identification of sex-linked SSR markers in a *Populus tremulaxPopulus tremuloides* cross. *Can J For Res.* 41(2):245–53.
- Pannell J., 1997. Mixed genetic and environmental sex determination in an androdioecious population of *Mercurialis annua*. *Heredity*, 78:50–58.
- Parasnis A.S., Ramakrishna W., Chowdari K. V., Gupta V.S., Ranjekar P.K., 1999. Microsatellite (GATA)n reveals sex-specific differences in papaya. *Theor Appl Genet* 99:1047–1052.
- Parker J.S., 1990. Sex chromosomes and sexual differentiation in flowering plants. *Chromosomes Today*, 10: 187-198.
- Parker, J.S. and Clark M.S., 1991. Dosage sex-chromosomes systems in plants. *Plant Science*, 80: 79 – 92.
- Peirce L. and Currence T.M., 1962. The inheritance of hermaphroditism in *Asparagus officinalis*. *Proc. of Am. Soc. Hort. Sci.*, 80: 368 –376.
- Peters J.L., Crude F., Gerats T., 2003. Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends Plant Sci* 8:484-491
- Ping-Xian Zhang, Si-Chao Yang, Yi-Feng Liu, Qing-Ling Zhang, Li-Qing Xu and Zheng-Rong Luo, 2016. Validation of a male-linked gene locus (OGI) for sex identification in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) and its application in F₁ progeny, Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, *Plant Breeding*, 135, 721–727.
- Polley A., Seigner E., and Ganai M.G., 1997. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. *Genome*, 40: 357-361.
- Prakash S. and Staden J.V., 2006. Sex identification in *Encephalartos natalensis* (Dyer and Verdoorn) using RAPD markers. *Euphytica*, 152:197– 200.
- Prasanthi L., Bhaskara Reddy B.V., Rekha Rani K., Maheswara Reddy P., Raja Reddy K., 2010. RAPD and SCAR marker for determination of sex in Simarouba (*Simarouba glauca*) for improved production. *J. Res. ANGRAU*, 38(1 and 2):1–5.
- Ray Ming, Abdelhafid Bendahmane, and Susanne S. Renner, 2011. Sex Chromosomes in Land Plants, *Annual Review of Plant Biology* Vol. 62:485-514.
- Reddy M.P., Sarla N. and Siddiq E.A., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128: 9-17.

- Riaz S., Krivanek A. F., Xu K. and Walker M. A., 2006. Refined mapping of the Pierce's disease resistance locus, PdR1, and Sex on an extended genetic map of *Vitis rupestris* x *V. arizonica*. *Theor. Appl. Genet.* 113, 1317–1329. doi: 10.1007/s00122- 006- 0385- 0.
- Rivas-Martinez S., 2000. Nocións sobre fitosociologia, Biogeografía y Bioclimatología, In: Peinado Lorca Y, Rivaz-Martinez S. La Vegetación de España, 1987. In: Diaz Barradas et al. 2000.
- Ruas C.F., Fairbanks D.J., Evans R.P., Stutz H.C., Andersen W.R., Ruas P.M., 1998. Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex garettii* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany*, 85: 162-167.
- Saiki R.K., Scharf S.J., Fallona F., Mullis K.B., Horn G.T., Elrich H.A., Arnheim N., 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science*, 230, 1350-1354.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scarf, S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A., 1988. *Primer* detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487-491.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanghamitra Samantaray, K. A., Geetha K.P., Hidayath and Satyabrata Maiti, 2010. Identification of RAPD markers linked to sex determination in guggal [*Commiphora wightii* (Arnott.)] *Bhandari Plant Biotechnol Rep* 4:95–99.
- Santos C., Tavares L.R, Pontes V., Alves P.M., McDougall G.J., Stewart D., Ferreira R.B., 2009. Portuguese crowberry (*Corema album*), an interesting antioxidant white berry. 4th International Conference on Polyphenols and Health, Harrogate, UK, 7-11 December 2009 (Poster). P13
- Sarmah P. and Sarma R.N., 2011. Identification of a DNA marker linked to sex determination in *Calamus tenuis* Roxb. An economically important rattan species in northeast India. *Mol. Breed.* 27: 115-118.
- Schmid R., 1978. Reproductive anatomy of *Actinidia chinensis* (Actinidiaceae). *Botanische Jahrbucher fur Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 100:149–150.
- Seabra R.C., 2001a. Melhoramento de espécies lenhosas: Aplicação da biotecnologia e biologia molecular. *Investigação Agrária*, Inia, 3(4).
- Seabra R.C., Simões A.M., Baeta J., Pais M.S., 2001b. Evaluation of Portuguese chestnut stands by RAPDs. *For. Snow Landsc. Res.*, 76(3), 435-438.
- Sharma K., Agrawal V., Prasad M., Gupta S., Kumar R. and Prasad M., 2008. ISSR marker-assisted selection of male and female plants in a promising dioecious crop, jojoba (*Simmondsia chinensis*). *Plant Biotechnol. Rep.* 2: 239-243.
- Shibu M.P., Ravishankar K.V., Lalitha. A. and Ganeshaiah K.N. and Umashankar, 2008. Identification of sex-specific DNA markers in the dioecious tree, nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). *PGR Newsl.*, FAO-Bioversity, 121:59 - 61.
- Shirkot P., Sharma D.R. and Mohapatra T., 2002. Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* var *deliciosa* by RAPD markers. *Sci. Hort.* 94: 33-39.

- Sim M.C., Lim P.E., Gan S.Y. and Phang S.M., 2007. Identification of RAPD marker for differentiating male from female sporophytic thalli of *Gracilaria changii*. *J. Appl. Physiol.* 19: 763 - 769.
- Simmonds N.W., 1979. Principles of Crop Improvement, Longman. p. 408
- Sinchan Adhikari, Soumen Saha, Tapas Kumar and Parthadeb Ghosh, 2016. Marker assisted sex determination in dioecious crops: An advancement in molecular biology and biotechnology, *Resersh Trends in Molecular Biology*, 35-70.
- Singh M., Kumar S., Singh A.K., Ram D., Kalloo G., 2002. Female sex associated RAPD marker in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.) *Curr. Sci.* 82(2):131–132.
- Skov E., 1998. Are RAPD markers reproducible between different laboratories? *Silvae Genetica*, 47, 286-288.
- Slotkin R.K., Martienssen R., 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Gen* 8:272–285
- Spielman M., Vinkenoog R., Dickinson G.H., Scott R.J., 2001 The epigenetic basis of gender in flowering plants and mammals. *Trends Genet* 17:705–711
- Spigler R.B., Lewers K.S., Main D.S., 2008. Ashman T-L. Genetic mapping of sex determination in a wild strawberry, *Fragaria virginiana*, reveals earliest form of sex chromosome, *Heredity.*, vol. 101: 507-517.
- Stephen L. Dellaporta e Alejandro Calderon-Urrea, 1993. Sex Determination in Flowering Plants, *The Plant Cell*, Vol.5, 1241-1251.
- Storchová H., Hrdlicková R., Chrtěk J.R.J., Tetera M., Fitze D., Fehrer J., 2000. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. *Taxon*, 49, 79-84.
- Takagi E., Togashi K., 2012. Evidence of sex change in *Ilex integra*. *Botany* 90:75–78
- Tenreiro R., 1995. *Análise taxonómica em Leuconostoro eccs: uma perspectiva polifásica*. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa.
- Thatte K.S., Deodhar M.A., 2012. Study of flowering behavior and sex determination in *Gracinia indica* (Thomas-Du Pettite) Choisy by means of molecular markers. *Biotechnology.*, Volume 11(4):232–237.
- Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., 1972 Webb D.A., editors. *Flora Europea. Diasporaceae to Myoporaceae*, Cambridge University Press, Cambridge, England, 3: p. 70.
- Uno Y., Li Y., Kanechi M. and Inagaki N., 2002. Haploid Production from Polyembryonic Seeds of *Asparagus officinalis* L., *Acta Hortic.*, vol. 589, pp. 2002– 2007.
- Valdes B., Talavera S., Fernandez-Galiano E., 1987. *Flora Vacular de Andalucia Occidental*, Ketres Editoria SA, Barcelona, Spain, 21: p. 485.
- Valdés B., Talavera S. and Galiano E. F., 1987. –Flora vascular de Andalucía occidental, vol 1-3. Ketres. Barcelona.
- Van Nigtevecht G., 1966a. Genetic studies in dioecious *Melandrium*. I. Sex-linked and sex-influenced inheritance in *M.album* and *M.dioicum*. *Genetica*, 37:281-306.

- Van Nigtevecht G., 1966 b. Genetic studies in dioecious *Melandrium*. II. Sex determination in *Melandrium album* and *Melandrium dioicum*. *Genetica*, 37:307-344.
- Vinod M.S., Prashanth S., Raghavan S., George S. and Parida A., 2007. Identification of a sex-specific SCAR marker in dioecious *Pandanus fascicularis* L. (Pandanaceae). *Genome*, 50: 834 - 839.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Rijans M., Van De Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.
- Vyskot B., Araya A., Veuskens J., Negrutiu I., Mouras A., 1993. DNA methylation of sex chromosomes in a dioecious *Melandrium album*. *Mol Gen Genet*, 239:219–224.
- Weil C., Martienssen R., 2008. Epigenetic interactions between transposons and genes: lessons from plants. *Curr Opin Gen Dev* 18:188–192
- Xu X., Peng G., Wu C., Korpelainen H., Li C., 2008. Drought inhibits photosynthetic capacity more in females than in males of *Populus cathayana*. *Tree Physiology* 28, 1751–1759.
- Yampolsky C. and Yampolsky H., 1922. Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibl. Genet.* 3, 1-62.
- Yang H., Gan S., Yin G. and Hu H., 2005. Identification of random amplified polymorphic DNA markers linked to sex determination in *Calamus simplicifolius* C.F. Wei. *J. Int. Plant Biol.* 47: 1249-1253.
- Yazdani R., Yeh F.C., Rimsha J., 1995. Genomic mapping of *Pinus sylvestris* (L.) using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Forest Genetics*, 2(2), 109-116.
- Yin T., DiFazio S.P., Gunter L.E., Zhang X., Sewell M.M., Woolbright S.A., Allan G.J., Kelleher C.T., Douglas C.J., Wang M., Tuskan G.A., 2008. Genome structure and emerging evidence of an incipient sex chromosome in *Populus*. *Genome Res* 18:422–430
- Younis R.A.A., Ismail O.M. and Soliman S.S., 2008. Identification of sex- specific DNA markers for datepalm (*Phoenix dactylifera* L.) using RAPD and ISSR techniques. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 4: 278-284.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics*, 20, 176-183.
- Zunzunegui M., Diaz Barradas M.C., Clavijo A., Alvarez Cansino L., Ain Lhout F., Garcia Novo F., 2006. Ecophysiology, growth timing and reproductive effort of three sexual forms of *Corema album* (Empetraceae). *Plant Ecology*, 183(1): 35–47.

Anexo 1

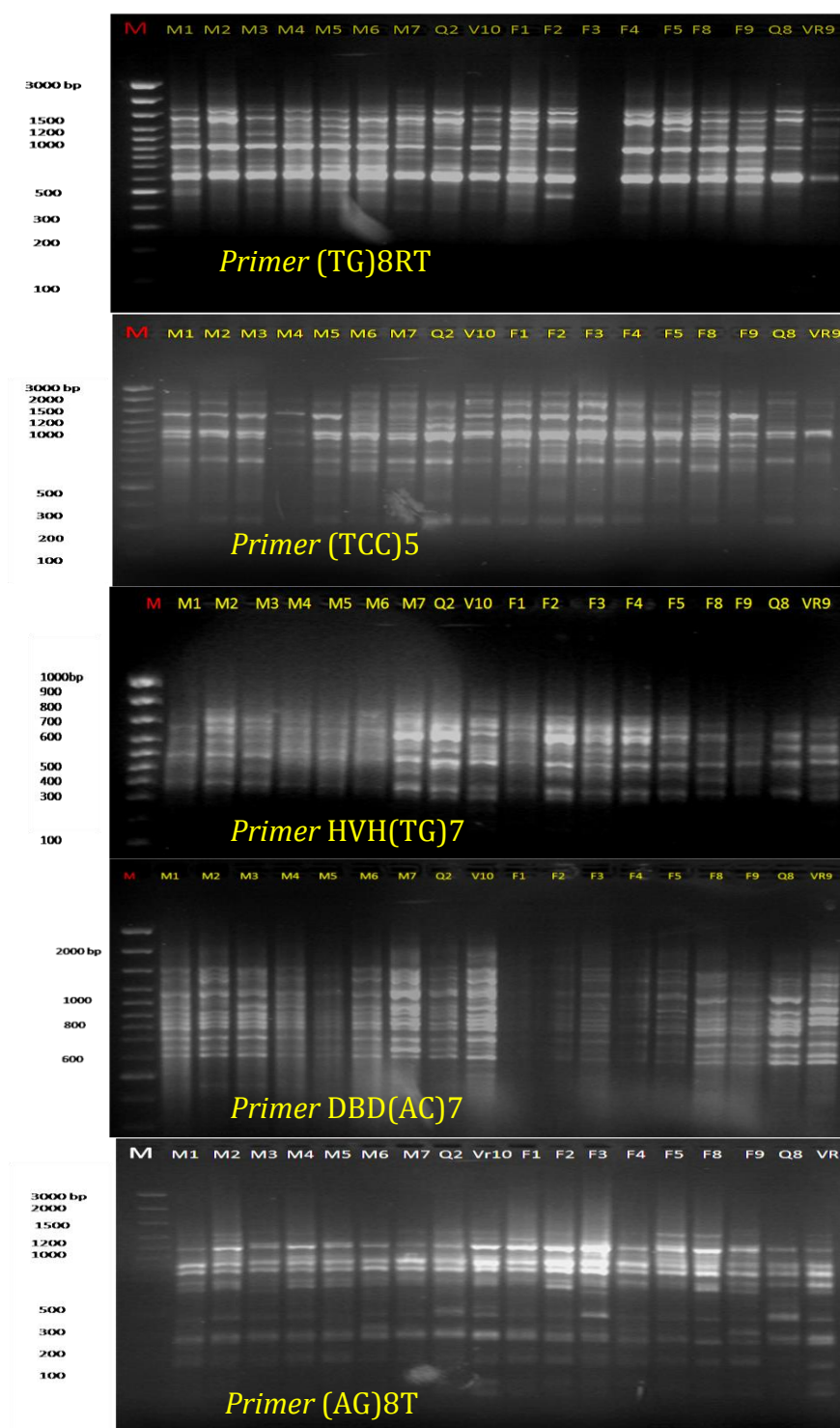


Figura 1- Geis de agarose (2%) das 18 amostras de *Corema album* amplificadas com os cinco primers selecionados, (TG)8RT; (TCC)5; HVH(TG)7; DBD(AC)7; (AG)8T, para análise de diversidade.

Anexo 2

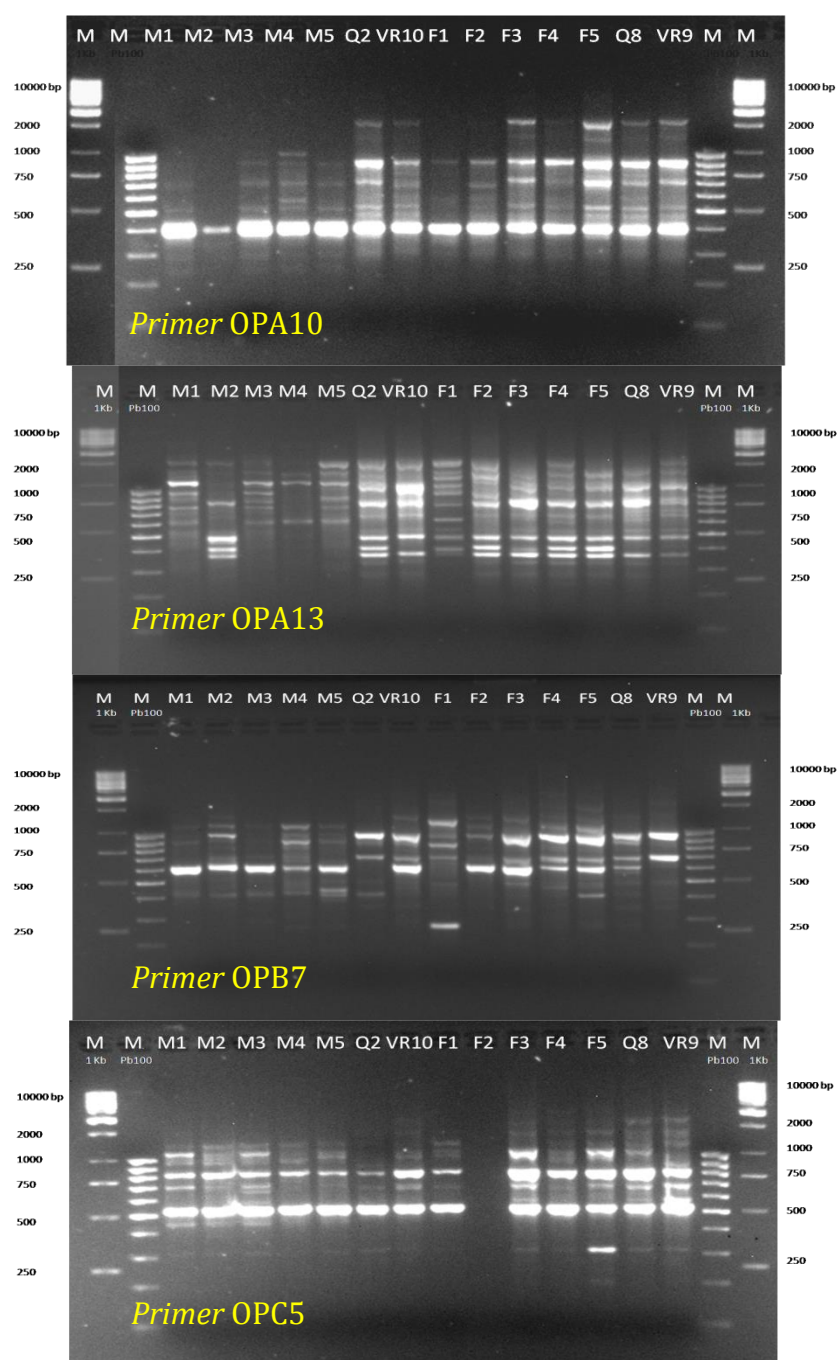


Figura 1 - Geis de agarose (2%) dos produtos amplificados com os primers OPA10; OPA13; OPB7; OPC5 das 14 amostras de *Corema album*.

Anexo 3

Quadro 1 – Matriz binária com as 24 bandas totais polimórficas referentes aos cinco *primers* ISSR: (TG)8RT (TCC)5; HVH(TG)7; DBD(AC)7; (AG)8T) testados nos 18 genótipos de *Corema album*.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y
1	18	24	9																						
	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b13	b14	b15	b16	b17	b18	b19	b20	b21	b22	b23	b24	
M1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	
M2	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	
M3	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	
M4	1	1	1	0	1	0	0	9	9	9	9	9	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
M5	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
M6	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	
M7	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	
MQ2	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	
MVR10	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	
F1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	9	9	9	9	0	0	1	1	
F2	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
F3	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	
F4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	
F5	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	
F8	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	
F9	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	
FQ8	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	
FVR9	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	

Quadro 2 – Matriz binária com as 19 bandas totais polimórficas referentes aos quatro *primers* RAPD: OPA10; OPA13; OPB7; OPC5 testados nos 14 genótipos de *Corema album*.

K20																									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T					
1	1	14	19	9																					
2	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b13	b14	b15	b16	b17	b18	b19						
3	M1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1					
4	M2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1					
5	M3	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1					
6	M4	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1					
7	M5	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1					
8	Q2	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0					
9	VR10	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1					
10	F1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1					
11	F2	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	9	9	0	9					
12	F3	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1					
13	F4	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1					
14	F5	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1					
15	Q8	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1					
16	VR9	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0					
17																									
18																									